

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Histologische, histochemische und ultrastrukturelle  
Untersuchungen an der Euterhaut des Rindes (*Bos taurus*)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Christiane Mattheis  
aus Wilhelmshaven

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld

Tag der Promotion: 08. Februar 2014



*In großer Dankbarkeit  
meiner Familie und Björn gewidmet*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Funktion der Euterhaut.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Aufbau der Euterhaut.....</b>	<b>3</b>
2.1.	Mikroskopische Anatomie der Epidermis .....	4
2.2.	Mikroskopische Anatomie des Coriums .....	5
2.2.1.	Haare (Pili) in der Euterhaut .....	5
2.2.2.	Talg- und Schlauchdrüsen in der Euterhaut .....	5
2.3	Mikroskopische Anatomie der Subcutis (Tela subcutanea).....	6
<b>3.</b>	<b>Innervation der Euterhaut .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Gefäßversorgung der bovinen Haut .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Pheromone in Duftdrüsen .....</b>	<b>7</b>
<b>6.</b>	<b>Lektinhistochemie .....</b>	<b>9</b>
6.1.	Definition und Historie der Lektine .....	9
6.2.	Vorkommen und Struktur der Lektine .....	10
6.3.	Klassifizierung der Lektine .....	11
6.4.	Funktion und Verwendung der Lektine .....	11
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>Gewinnung und Präparation der Euterhautproben.....</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>Fixierung und Materialvorbereitung für die Lichtmikroskopie .....</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>Konventionelle histologische Färbungen .....</b>	<b>17</b>
4.1.	Hämalaun-Eosin (H.E.) nach Meier .....	17
4.2.	Alcianblau .....	17
4.3.	Trichromfärbung nach Masson und Goldner .....	18
4.4.	Periodic-Acid-Schiff-Reaction (PAS) nach Mc Manus .....	19
4.5.	Resorcin-Fuchsin-van-Gieson-Färbung .....	19
<b>5.</b>	<b>Glykohistochemische Untersuchungen .....</b>	<b>20</b>
<b>6.</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungen .....</b>	<b>23</b>

<b>7.</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>26</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
<b>1.</b>	<b>Ergebnisse der konventionellen histologischen Färbungen .....</b>	<b>27</b>
1.1.	Übersicht über den Aufbau der Epidermis der bovinen Euterhaut .....	27
1.2.	Übersicht über den Aufbau der Dermis der bovinen Euterhaut .....	30
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen .....</b>	<b>39</b>
2.1.	Expression von $\alpha$ -SMA in der bovinen Euterhaut .....	39
2.2.	Expression von Vimentin in der bovinen Euterhaut .....	41
2.3.	Expression von GFAP in der bovinen Euterhaut .....	44
2.4.	Expression von Desmin in der bovinen Euterhaut .....	46
2.5.	Expression von Pancytokeratin in der bovinen Euterhaut .....	48
2.6.	Expression von Kollagen-1 in der bovinen Euterhaut .....	51
2.7.	Expression von Laminin in der bovinen Euterhaut .....	52
2.8.	Expression von COX-1 in der bovinen Euterhaut .....	55
2.9.	Expression von COX-2 in der bovinen Euterhaut .....	57
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen .....</b>	<b>61</b>
3.1.	Pflanzliche Glukose- bzw. Mannose-bindende Lektine .....	62
3.1.1.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Pisum sativum Agglutinin (PSA) .....	62
3.1.2.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Canavalia ensiformis Agglutinin (ConA) .....	63
3.1.3.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Lens culinaris Agglutinin (LCA) .....	65
3.2.	Pflanzliche D-Galaktose bindende Lektine .....	65
3.2.1.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Ricinus Communis Agglutinin (RCA) .....	65
3.2.2.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Griffonia simplicifolia Lektin 1 (GSL-1) .....	66
3.2.3.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Peanut Agglutinin (PNA) .....	67
3.3.	Pflanzliche N-Acetyl-D-Galactosamin/D-Galactosamin bindende Lektine ..	67
3.3.1.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Soybean Agglutinin (SBA) ...	

	.....	67
3.3.2.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Sophora japonica Agglutinin (SJA).....	68
3.3.3.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Sambucus nigra Agglutinin (SNA) .....	68
3.3.4.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA).....	69
3.4.	Pflanzliche N-Acetyl-D-Glucosamin bzw. N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine .....	69
3.4.1.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Wheat Germ Agglutinin (WGA).....	69
3.4.2.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (s-WGA) .....	71
3.5.	Pflanzliche L-Fucose bindende Lektine .....	71
3.5.1.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1).....	71
3.6.	Pflanzliche Lektine mit Oligosaccharidbindungsstellen .....	72
3.6.1.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L) .....	72
3.6.2.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) .....	73
3.6.3.	Überprüfung der Bindungseigenschaften von Maackia amurensis Agglutinin 1 (MAA-1) .....	74
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen .....</b>	<b>75</b>
4.1.	Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung der bovinen Epidermis...	75
4.1.1.	Das Stratum corneum und das Stratum granulosum .....	75
4.1.2.	Das Stratum spinosum.....	79
4.1.3.	Das Stratum basale und die Basalmembran .....	84
4.2.	Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung der bovinen Dermis .....	86
4.2.1.	Übersicht über die bovine Dermis.....	86
4.2.2.	Muskelzellen .....	88
4.2.3.	Nerven .....	91
4.2.4.	Blutgefäße und Mastzellen.....	93
4.2.5.	Talgdrüsen .....	96

---

<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>1.</b>	<b>Diskussion der histomorphologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen.....</b>	<b>99</b>
<b>2.</b>	<b>Diskussion der immunhistochemischen Untersuchungen .....</b>	<b>104</b>
<b>3.</b>	<b>Diskussion der glykohistochemischen Untersuchungen .....</b>	<b>108</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>112</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>115</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>117</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>126</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>128</b>
<b>XI.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>129</b>
<b>1.</b>	<b>Lichtmikroskopie .....</b>	<b>129</b>
1.1.	Chemikalien zur Fixierung.....	129
1.2.	Puffer .....	129
1.3.	Lösungen für die histologischen Färbungen .....	130
<b>2.</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>134</b>
<b>3.</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>135</b>
3.1.	Chemikalien zur Fixierung.....	135
3.2.	Puffer .....	135
3.3.	Kontrastierungslösungen .....	136
3.4.	Einbettmedien.....	136
3.5.	Färbe- und Nachkontrastierungsmedien.....	136
<b>4.</b>	<b>Glykohistochemie .....</b>	<b>137</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>138</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth muscle actin
äHWS	äußere Haarwurzelscheide
Aqua dest.	Aqua destillata
Ax	Axone
Bdgw	Bindegewebe
BG	Blutgefäß
BM	Basalmembran
BZ	Basalzelle
Bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
ConA	Canavalia ensiformis Agglutinin
D	Dermis
DA	Drüsenanlage
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinophenylindol-dihydrochlorid
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
De	Desmosomen
DP	Dermale Papille
DWS	Dermale Wurzelscheide
DZ	Dendritische Zellen
Ery	Erythrozyt
Et	Endothel
Ez	Endothelzelle

---

Fb	Fibroblast
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK	Feuchtkammer
Fz	Fibrozyt
G	Glykogen
glM	Glatte Muskulatur
Go	Golgi-Apparat
GSL-1	Griffonia simplicifolia Lektin-1
H	Haar
HA	Haare
HC	Haarkutikula
Hc	Heterochromatin
HE	Hämalaun-Eosin
Hf	Haarfollikel
HGM	Hintergliedmaße
HK	Haarkanal
HM	Haarmark
HR	Haarrinde
HV	Hinterviertel
HWS	epitheliale Haarwurzelscheide
HZ	Haarzwiebel
IF	Intermediärfilamente
iHWS	innere Haarwurzelscheide
Iz	Interzellularraum
K	Keratohyalinvesikel
Ka	Kapillare

---

KF	Keratinfilamente
Km	Kernmembran
Ko	Kollagenfasern
Kp	Kernporen
L	Lumen
Lb	Lamina basalis
LCA	Lens culinaris Agglutinin
Ly	Lymphozyt
Ma	Mastzelle
M- $\alpha$ -M	Methyl-alpha-Mannopyranoside
MAA-1	Maackia amurensis Agglutinin-1
Map	Musculus arrector pili
Max	Mesaxon
Mi	Mitochondrium
min	Minuten
mm	Millimeter
mNf	Marklose Nervenfasern
Mo	Monate
Mv	Mikrovilli
MZ	Merkelzelle
$\mu$ m	Mikrometer
N	Nukleus
n-Acgal	N-Acetylgalactosamin
Nc	Nucleolus
Ne	Nerv
nm	Nanometer



---

PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reaction
PBS	phosphate buffered saline solution
Pc	Processus cellularis
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
Pz	Perizyt
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RT	Raumtemperatur
SB	Scale bar
Sb	Stratum basale
Sb	suprabulbär
SBA	Soybean Agglutinin
SD	Schweißdrüse
SDE	Endstücke der Schweißdrüse
Sek	Sekunden
Sg	Stratum granulosum
SJA	Sophora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
Sp	Stratum papillare
Sr	Stratum reticulare der Dermis
Ssp	Stratum spinosum
s-WGA	succinyliertes Wheat germ Agglutinin
T	Tage

---

TD	Talgdrüse
TDA	Talgdrüsenausführungsgang
Te	Tunica externa
Ti	Tunica interna
Tm	Tunica media
UEA-1	Ulex europaeus Agglutinin-1
V	Vakuole
VAA	Viscum album Agglutinin
Vs	Vesikel
WGA	Wheat germ agglutinin
ZM	Zellmembran
z.T.	zum Teil

## I. EINLEITUNG

Die Haut (*Integumentum commune*) ist eines der wichtigsten und größten Organsysteme des Körpers und erfüllt eine Vielzahl an Funktionen. Sie bietet dem Körper Schutz vor thermischen, mechanischen, chemischen und mikrobiellen Einflüssen. Zudem besitzt sie verschiedene Drüsen (Talg- und Schweißdrüsen), die eine wichtige Rolle in der Thermoregulation, dem Wasserhaushalt und auch in der Kommunikation der einzelnen Individuen durch Duftstoffe (Pheromone) spielen (SINOWATZ et al., 2006).

Die Euterhaut hat eine wichtige schützende Funktion für die Milchdrüse und entspricht in ihrem wesentlichen Aufbau der äußeren Haut (LUDEWIG et al., 1996). Zudem ist die Zitze der Milchkuh eine häufige Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen, die Euterinfektionen auslösen. Aus diesem Grund bieten sich weitere histomorphologische und ultrastrukturelle Untersuchungen der (Zitzen-) Haut zur besseren Kenntnis der immunologischen Zellabwehr an. Die Haut der Zitzen ist reich an sensiblen Nervenfasern und Mechanorezeptoren und spielt eine wichtige Rolle beim Milchausschüttungsreflex.

Eine besondere Bedeutung kommt der Euterhaut des Rindes heutzutage in der pharmakologischen Forschung zu. KIETZMANN et al. (1993) entwickelten das isolierte perfundierte Rindereuter als ein *in vitro* Modell (BUS-Modell= bovine udder skin) zur Testung der perkutanen Absorption und Penetration verschiedener Stoffe und Medikamente. Mittlerweile ist dieses Modell etabliert und wird unter anderem zur Prüfung von Hautverträglichkeiten und Wirksamkeiten von Hautschutzmitteln verwendet.

Die Haut des Euters bzw. der humanen Brust spielt eine besondere Rolle bei der Produktion von Duft-Botenstoffen (Pheromonen). Ausgehend von den Hautdrüsen des Euters können diese Pheromone bei der Neugeborenen-Mutter-Zitzen-Interaktion beim Saugvorgang eine Rolle spielen (BLASS, 2003; SCHAAL et al., 2003). Basierend auf dieser Fragestellung wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf augenscheinliche histologische Unterschiede der Euterhaut von juvenilen nicht-laktierenden und adulten laktierenden Rindern gelegt.

Über die Histomorphologie der bovinen Euterhaut liegen in der aktuellen Literatur bisher nur sehr wenige Ergebnisse vor (LUDEWIG et al., 1996). Zudem gibt es noch keine Informationen über die Ultrastruktur sowie die Herkunft, Art und Kohlenhydratzusammensetzung der Glykoproteine der Euterhaut. Um weitere Erkenntnisse zu ihrem Aufbau und ihrer Funktion zu erhalten, wurden in dieser Arbeit verschiedene ultrastrukturelle, lichtmikroskopische, immun- und glykohistochemische Methoden angewandt.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Funktion der Euterhaut**

Die Euterhaut entspricht in ihrem generellen Aufbau und ihren Funktionen der äußeren Haut. Sie bietet dem Körper Schutz vor mechanischen, thermischen, chemischen und mikrobiellen Einflüssen aus der Umwelt. Zudem wirkt Sie als Barriere gegen den Verlust von Wasser und Elektrolyten und ist aktiv an der Thermoregulation beteiligt. Auch das Vorhandensein von spezifischen Immunzellen macht die Haut zu einem wichtigen Organ der körperlichen Immunabwehr (SINOWATZ et al., 2006). In der Haut der Zitze gibt es viele sensible Nervenfasern und Mechanorezeptoren, die eine wichtige Rolle beim Milchausschüttungsreflex spielen (WEYRAUCH & SMOLLICH, 1998).

### **2. Aufbau der Euterhaut**

Die Euterhaut bedeckt die Milchdrüse und entspricht mit ihrem dreischichtigen Aufbau in Epidermis (Oberhaut), Corium (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) dem der äußeren Haut. Makroskopisch ist sie je nach Region verschiebbar, dünn und spärlich behaart, wobei die Haare immer einzeln liegen.

Die Epidermis wird von einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel gebildet und zeigt an den verschiedenen Euterlokalisationen eine unterschiedliche Dicke (von ca. 60 - 200 µm). Im Corium finden sich Haare, Talg- und Schlauchdrüsen, wobei das Vorhandensein von Drüsen immer an Haare gekoppelt ist. Die Haarbalgmuskeln (Mm. arrectores pilorum) sind kräftig ausgebildet und zahlreich vorhanden. In der Euterhaut gibt es keine ekkrinen, sondern nur apokrine Schlauchdrüsen (Schweißdrüsen) (LUDEWIG et al., 1996).

Die Epidermis- und Coriumschichten sind durch ein unterschiedlich hohes Stratum papillare fest miteinander verbunden. Die nachfolgende Subcutisschicht ist sehr dünn und besteht aus einem weitmaschigen Netz von Bindegewebsfasern. Sie zeichnet sich durch das Vorhandensein von zahlreichen Blutgefäßen und besonders weitlumigen Venen aus (LUDEWIG et al., 1996).

Die Haut der Zitzen ist, auf Grund einer fehlenden Subcutisschicht, nicht von der Unterlage abhebbar (HOSPES & SEEH, 1999). Zudem gibt es in diesem Bereich

keine Haare und Drüsen (LUDEWIG et al., 1996).

### **2.1. Mikroskopische Anatomie der Epidermis**

Die Epidermis ist die oberste Schicht der Haut und entwickelt sich embryonal aus dem Ektoderm (SINOWATZ, 2010). Sie wird von einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel gebildet und besteht grundsätzlich aus einem Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum (WEYRAUCH & SMOLLICH, 1998). Als Besonderheit der Euterhaut des Rindes ist ein fehlendes Stratum lucidum zu nennen (LUDEWIG et al., 1996).

Die Schichten der Epidermis bestehen zu 90% aus Keratinozyten. Bei den restlichen Zellen handelt es sich zum einen um Melanozyten, die für die Pigmentierung der Haut mit Melanin verantwortlich sind. Zum anderen kommen Langerhans-Zellen und Lymphozyten als Zellen des Immunsystems sowie Merkelzellen als neuroendokrine Sinnes- bzw. Tastzellen vor (FRITSCH, 1998). In den basalen Schichten kommt es zu einer ständigen Neubildung der Keratinozyten, die sich nach und nach an die Oberfläche schieben. Dabei kommt es zu einem Umwandlungsprozess der Zelle von wenig differenziert und teilungsfähig zu hochdifferenziert und nicht mehr teilungsfähig. Schließlich sterben die Keratinozyten unter Ausbildung der Hornschicht (Stratum corneum) ab (FRITSCH, 1998).

Das Stratum basale der Euterhaut besteht aus einer einschichtigen Lage hochprismatischer, teils polymorpher Zellen, die der Basallamina aufliegen und vertikal ausgerichtet sind. Die nachfolgende Schicht des Stratum spinosum (Stachelzellschicht) besteht aus bis zu acht Zelllagen rhombischer oder polygonaler Zellen, die über lange Desmosomen miteinander verbunden sind. In den Zwischenzellräumen sind häufig Interzellularspalten sichtbar (LUDEWIG et al., 1996).

Dass darüber liegenden Stratum granulosum ist durch die typische basophile Keratohyalin granula im Zellzytoplasma und eine deutliche Abflachung der Zellen gekennzeichnet. Die abschließende Schicht, das Stratum corneum (Hornschicht), lässt sich in ein Stratum conjunctum und ein Stratum disjunctum unterteilen. Das schmale Stratum conjunctum besteht aus kernlosen, plättchenartigen, verhornten, kompakt miteinander über zahlreiche Desmosomen verbundene Zellen. Es liegt dem Stratum granulosum direkt auf. Im Stratum disjunctum zerfällt die Hornschicht durch intakt gebliebene Enzyme in Einzelzellen, sodass diese Schicht durch abgelöste, locker aufliegende Hornlamellen gekennzeichnet ist (LUDEWIG

et al., 1996; FRITSCH, 1998).

## **2.2. Mikroskopische Anatomie des Coriums**

Das Corium der Euterhaut schließt unterhalb der Epidermis an und ist mesodermalen Ursprungs (SINOWATZ, 2010). Es ist relativ dick und lässt sich histologisch auf Grund der Dichte und Anordnung des Kollagenfasergerüsts in zwei Schichten unterteilen. Direkt unterhalb der Epidermis schließt sich das Stratum papillare (Papillarschicht) an, das durch feine, dicht gelagerte und maschenförmig angeordnete kollagene Bindegewebsfasern gekennzeichnet ist (LUDEWIG et al., 1996). Es ist durch papillenartige Vorstülpungen mit der Epidermis verzahnt um sowohl einen festen mechanischen Zusammenhalt als auch eine Oberflächenvergrößerung für den Stoffaustausch zwischen Epidermis und Corium zu erzielen (SINOWATZ et al., 2006). Der Papillarkörper des Stratum papillare ist in den einzelnen Euterabschnitten unterschiedlich hoch und weist viele haarnadelförmige, subepithelial liegende Kapillaren auf. Zudem lässt sich eine relativ hohe Anzahl an Fibrozyten und Immunzellen (Mastzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen) beobachten. Das darunter liegende Stratum reticulare (Geflechschicht) ist durch eine lockere und grobe Anordnung der kollagenen Bindegewebsfasern charakterisiert. Im Corium liegen Haare, Talg- und Schlauchdrüsen (LUDEWIG et al., 1996).

### **2.2.1. Haare (Pili) in der Euterhaut**

Die Euterhaut besitzt sowohl behaarte als auch unbehaarte Bereiche. Die Zitzenhaut ist ausnahmslos unbehaart. Die Haare der Euterhaut liegen stets einzeln und weisen den typischen anatomischen und histologischen Aufbau auf. Sie sind über den bindegewebigen Haarbalg fest im Corium verankert. Die stets auf der Seite der Haarneigung liegenden Haarbalgmuskeln (Mm. arrectores pilorum) sind kräftig ausgebildet und zahlreich vorhanden (LUDEWIG et al., 1996).

### **2.2.2. Talg- und Schlauchdrüsen in der Euterhaut**

Das Vorkommen von sämtlichen Drüsen in der Euterhaut ist stets an das Vorhandensein von Haaren gekoppelt (LUDEWIG et al., 1996). Demnach ist die Haut der Zitzen drüsenlos (MICHEL, 1994).

Die mehrlappigen Talgdrüsen der Euterhaut entsprechen in ihrem Aufbau den typischen holokrinen Drüsen. Sie zeichnen sich durch ihre Größe aus und liegen

meist nur auf einer Seite des Haarbalges. Auffallend ist eine relativ kräftige, die Talgdrüse umgebende Membrana propria.

Die apokrinen Schlauchdrüsen besitzen ein einschichtiges Epithel aus abgeflachten Zellen. Myoepithelzellen umgeben die Drüsenepithelzellen mit darauf folgender Basalmembran. Es gibt keine ekkrinen Schlauchdrüsen (Schweißdrüsen) in der Euterhaut des Rindes (LUDEWIG et al., 1996).

### **2.3 Mikroskopische Anatomie der Subcutis (Tela subcutanea)**

Die Subcutis mesodermalen Ursprungs ist relativ dünn und schlecht vom darüber liegenden Corium abgrenzbar. Sie besteht aus einem weitmaschigen Bindegewebsfasernetz und steht in direkter Verbindung zur bindegewebigen Kapsel des Euters. Auffällig ist das Fehlen von Adipozyten und dass zahlreiche Vorhandensein von weitlumigen Venen (LUDEWIG et al., 1996).

## **3. Innervation der Euterhaut**

Nach MICHEL (1993) variiert die Innervation der Euterhaut in den verschiedenen Bereichen des Euters. Die Haut der Zitzenspitze zeigt eine reiche Innervation mit im subepithelialen Bindegewebe liegenden Nervenfasern, die weiträumige Geflechte bilden. In der bindegewebig-muskulösen Mittelschicht gibt es dichte Aufzweigungen mit Bildung von feinen Fasern, die eine Beziehung zu glatten Muskelfasern erkennen lassen. Des Weiteren gibt es viele Nervenfasern die perivaskulär in der Haut der Zitzenspitze liegen. Typische Mechanorezeptoren sind in dieser Hautlokalisation nicht vorhanden, jedoch im Bereich der Zitzenmitte.

Im Bereich der Zitzenbasis zeigen sich in der Tiefe der Hautschicht starke Faserbündel, die aus den Aufzweigungen der Euternerven entstehen. Zudem gibt es in geringer Anzahl Mechanorezeptoren und in der subepidermalen Schicht Nerven-geflechte, die intraepitheliale Endigungen bilden. Die Innervation der Haut nimmt von der Zitzenspitze in Richtung Euterkörper immer weiter ab (MICHEL, 1993). Generell weisen stark behaarte Hautgebiete eine deutlich geringere Anzahl an Nerven auf als schwach- oder unbehaarte Hautbezirke (HABERMEHL, 2005).

Die Innervation der Haut des Euterkörpers ist in den verschiedenen Regionen des Euters relativ ähnlich. Auffallend ist in diesem Bereich eine geringe Dichte der Nervenfasernetze. In der Tiefe liegen größere Faserbündel, die Aufzweigungen zum Epithel zu den Blutgefäßen und zu den Haarbälgen entlassen. Im Bereich der



Haarbälge lassen sich typische Nervenflechte sowie eine Verbindung dieser zu den Haarbalgmuskeln beobachten. Zudem sind einige perivaskuläre Nervenfasern vorhanden (MICHEL, 1993). Die Innervation von Blutgefäßen, Hautdrüsen und glatter Muskulatur durch vegetative Nerven erfolgt ausschließlich sympathisch, da eine parasympathische Innervation der Haut fehlt (LIEBICH & KÖNIG, 2011).

#### **4. Gefäßversorgung der bovinen Haut**

Die Blutversorgung der Haut des Rindes wird durch drei in Verbindung stehende arterielle Blutgefäßnetze und vier venöse Hautnetze gesichert. Das fasziale oder subkutane Netz liegt der oberflächlichen Faszie auf und versorgt die Subcutis (HABERMEHL, 2005). Arterien und Venen verlaufen in diesem Bereich meist zusammen und sie geben verschieden starke aufsteigende Äste in die Coriumschicht ab (LOEFFLER, 1966). Diese bilden durch Aufzweigungen in den tiefen Coriumschichten das kutane Netz, welches die Schweißdrüsen versorgt. In den oberen Schichten des Coriums nahe der Epidermis liegt das engmaschige subpapilläre Netz zur Versorgung der Haarbälge und Talgdrüsen. Viele der kleinen Gefäße dieser Schicht anastomosieren miteinander, sodass ein gemeinsames Kanalsystem von arteriellen Zu- und venösen Abflüssen vorliegt (LOEFFLER, 1966; HABERMEHL, 2005). Zudem entsendet dieses Gefäßnetz Kapillarschlingen in die Papillarkörper, die in keiner Verbindung zu anderen Arterien stehen und somit Endarterien sind (HABERMEHL, 2005; LIEBICH & KÖNIG, 2011).

Die Epidermis ist gefäßlos und wird durch Diffusion und aktiven Transport von Nährstoffen durch die Interzellularspalten ernährt.

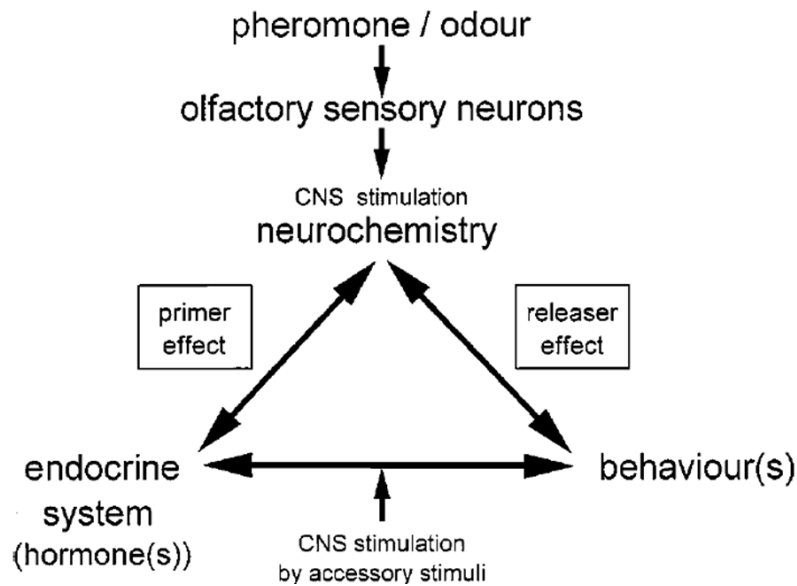
Zu den Aufgaben der Blutgefäße der Haut zählen neben der Ernährung auch die Blutdruck- und Temperaturregulation des Organismus (HABERMEHL, 2005).

Der Aufbau des Blutgefäßsystems der Euterhaut des Rindes entspricht weitestgehend dem oben beschriebenen System. Auffallend sind die zahlreichen Blutgefäße (vor allem weitlumige Venen) in der Unterhaut (LUDEWIG et al., 1996).

#### **5. Pheromone in Duftdrüsen**

Die Stoffgruppe der Pheromone wurde 1959 das erste Mal von BUTENANDT et al. (1959) chemisch identifiziert und ist nun schon seit vielen Jahrzehnten Gegenstand aktueller Forschungen (WYATT, 2010). Der Name setzt sich zusammen aus

„pherein“ (griech.: transportieren) und „hormon“ (griech.: in Bewegung setzen, antreiben). Pheromone sind definiert als Substanzen, die von einem Individuum nach außen sezerniert werden, von einem anderen Individuum der gleichen Spezies empfangen werden und bei diesem eine spezifische Reaktion, z. B. ein definiertes Verhalten oder einen Entwicklungsprozess, auslösen (KARLSON & LÜSCHER, 1959). Die Mehrzahl der Pheromone wird olfaktorisch durch das Individuum aufgenommen. Dabei werden die Pheromone direkt vom Vomeronasalen-Organ und dem Olfaktorischen System wahrgenommen. Eine kleine Pheromongruppe wird auf chemosensorischem Weg (z. B. Geschmack) detektiert. Die Gruppe der sogenannten Allohormon-Pheromone wirkt direkt auf Gewebe oder im ZNS (WYATT, 2010). Die Antwort eines Individuums auf Pheromone ist angeboren und wird meist nicht durch einen Lernprozess entwickelt (BRENNAN & ZUFALL, 2006). Bei Kaninchen konnte z. B. ein Pheromon (2-Methylbut-2-enal) in der Muttermilch nachgewiesen werden, das durch das olfaktorische System der Kaninchenbabys detektiert wird und bei ihnen ein vermehrtes „Zitzensuchverhalten“ auslöst (HUDSON, 1985). Beim Menschen konnte festgestellt werden, dass Neugeborene vom Duft der Brust einer Mutter angezogen werden und sie sich in Richtung des Duftes bewegen. Dies ist vergleichbar mit den sogenannten Releaser-Wirkungen der Pheromone bei verschiedenen Säugetierspezies (VARENDI & PORTER, 2001). Beim Releaser-Effekt kommt es zu einer direkten Antwort des Individuums auf eine Pheromon-Einwirkung, die sich in einem bestimmten Verhalten äußert. Beim sogenannten Primer-Effekt wirkt das Pheromon indirekt, indem es eine Hormonsekretion hervorruft, die wiederum zu physiologischen Veränderungen, z. B. des Verhaltens, eines Individuums führt. Pheromone sind im gesamten Tierreich weit verbreitet und dienen der Kommunikation untereinander (WYATT, 2003; WYATT, 2009). Die Quantität und Zusammensetzung der Pheromone eines einzelnen Individuums variiert durch verschiedene Faktoren, u. a. durch das Alter eines Tieres (LASSANCE & LÖFSTEDT, 2009; WYATT, 2009).



**Abb. 1: Übersicht über den Wirkmechanismus von Pheromonen mit „Releaser“- und „Primer“-Effekt auf ein Individuum (nach WYATT, 2003)** CNS= Zentralnervensystem

## 6. Lektinhistochemie

### 6.1. Definition und Historie der Lektine

Die Lektine wurden von GOLDSTEIN (1980) wie folgt definiert: „*Ein Lektin ist ein zuckerbindendes Protein oder Glykoprotein nichtimmunogenen Ursprungs, das Zellen agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert*“.

Heutzutage definiert man Lektine als „*kohlenhydratspezifische Proteine, die sich deutlich von Antikörpern, ligandenbindenden Enzymen und Zuckersensoren/Transportproteinen unterscheiden*“ (GABIUS, 2009).

Entdeckt wurden sie erstmals von STILLMARK (1888). Dieser erforschte im Rahmen seiner Dissertation das Agglutinieren von Erythrozyten durch den toxischen Pflanzeninhaltsstoff Rizin, welcher aus den Samen von *Ricinus communis* stammt. Auf Grund dieser agglutinierenden Eigenschaft wurden Lektine damals als Hämagglutinine bezeichnet. Mit Voranschreiten der Forschung wurden immer mehr Lektine aus Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen isoliert. LANDSTEINER machte 1908 während seiner Untersuchungen zu den Blutgruppensystemen die bemerkenswerte Entdeckung, dass die Agglutination der Erythrozyten durch

Pflanzeninhaltsstoffe bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich ausgeprägt war. Er vermutete eine Selektivität der lektin-medierten Agglutination (LANDSTEINER & RAUBITSCHKE, 1908). Einen großen Beitrag zur Bestätigung dieser Hypothese machte SUMNER (1919). Ihm gelang es das erste Lektin Concanavalin A (ConA) in Reinform aus *Canavalia ensiformis* zu gewinnen. Zudem konnte er durch seine Untersuchungen nachweisen, dass ConA sowohl Erythrozyten und Stärke agglutiniert als auch Muzine und Glykogen präzipitiert. Als weitere Entdeckung konnten SUMNER & HOWELL (1936) eine Hemmung der Hämagglutination durch Zugabe von Zuckern (z. B. Sucrose) nachweisen. Dies bestätigte die frühe Vermutung Landsteiners bezüglich einer Selektivität der Lektine für bestimmte Kohlenhydrate. Auf Grund dieser Eigenschaften erhielten sie von BOYD & SHAPLEIGH (1954) ihren endgültigen Namen „Lektin“, der sich ursprünglich vom lateinischen Wort „legere“ (=auswählen) ableitet.

## **6.2. Vorkommen und Struktur der Lektine**

Lektine sind in der Umwelt weit verbreitete (Glyko-) Proteine, die in Pflanzen, Mikroorganismen, Pilzen und Säugetieren vorkommen (RÜDIGER & GABIUS, 1993). Mehr als die Hälfte aller bekannten Lektine stammen aus der Pflanzenfamilie der Leguminosen. Die Konzentration eines Lektins in einer Pflanze kann stark variieren und ist meist in den Samen am höchsten. In den Zellen liegen die Lektine zusammen mit Speicherproteinen, Enzymen und Phytin in membranständigen Proteinkörperchen vor (GABIUS, 2009).

Alle Lektine besitzen zwei oder mehrere Zuckerbindungsstellen pro Molekül mit denen sie Zellen agglutinieren und/oder komplexe Kohlenhydrat-Konjugate präzipitieren (MODY et al., 1995). Ihre Bindung löst keinerlei enzymatische Reaktion aus und sie werden nicht wie die zuckerbindenden Immunglobuline vom Immunsystem kontrolliert (RÜDIGER & GABIUS, 2001).

Trotz vieler gemeinsamer Eigenschaften weisen die Lektine eine große strukturelle Vielfalt innerhalb der Gruppe auf. Die Lektine unterscheiden sich vor allem in Bezug auf die Aminosäuren-Zusammensetzung, das Molekulargewicht, die Metallionenverteilung als Co-Faktoren und die dreidimensionale Struktur (Tertiär- oder Quartärstruktur). Sie bestehen zum größten Teil aus zwei bis vier Untereinheiten, wobei meistens eine Untereinheit je eine Zuckerbindungsstelle besitzt (SHARON, 1987). Lektine binden überwiegend an endständige, nicht-

reduzierende Zucker, wobei einige auch die Fähigkeit besitzen innere Kohlenhydratverbindungen zu erkennen (z. B. CON A bindet an interne Mannose- (MAN) Strukturen) (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986; GABIUS & GABIUS, 1993).

### 6.3. Klassifizierung der Lektine

Die Lektine werden nicht wie früher nach ihrer Herkunft in chemische Kategorien, sondern anhand ihrer Zuckerspezifität (Bindungsaffinität) in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986; GABIUS, 2009; LOHR et al., 2010; GABIUS, 2011a; GABIUS et al., 2011b). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Lektingruppen und die in dieser Arbeit verwendeten Lektine bzw. ihre Eingruppierung.

**Tabelle 1: Lektingruppen und die verwendeten Lektine in der Übersicht**

Lektingruppe/ Zuckerspezifität	Verwendete Lektine
Gruppe 1: D-Glucose bzw. D-Mannose bindende Lektine	Con A PSA LCA
Gruppe 2: D-Galactose bindende Lektine	RCA PNA GSL-1
Gruppe 3: N-Acetyl-D-Galactosamin <sup>1</sup> /D-Galactose <sup>2</sup> bindende Lektine	SBA <sup>1</sup> SJAbio <sup>1</sup> DBA <sup>1</sup> SNAbio <sup>1,2</sup>
Gruppe 4: N-Acetyl-D-Glucosamin <sup>3</sup> /N-Acetyl-Neuraminsäure <sup>4</sup> bindende Lektine	WGA <sup>3,4</sup> s-WGA <sup>3</sup>
Gruppe 5: L-Fukose bindende Lektine	UEA-1
Gruppe 6: Lektine mit Oligosaccharidbindungsstellen	PHA-E PHA-L MAL-1bio

Verwendete Lektine: bio: biotinyliert

### 6.4. Funktion und Verwendung der Lektine

Die biologischen Funktionen von pflanzlichen Lektinen sind vielschichtig und noch nicht vollständig entschlüsselt. Zum Beispiel spielen sie eine wichtige Rolle in der Abwehr durch Toxine, wie z. B. bei *Ricinus communis* in den pflanzlichen Samen. Die Toxine verhindern eine Aufnahme der Samen durch Fressfeinde (GABIUS, 2009). Des Weiteren wirken sie bei der wasser- und raumsparenden

Packung von Speicherproteinen in den Speichervakuolen der Leguminosensamen mit (SCHAEFER et al., 1979). Einige weitere Funktionen werden diskutiert, sind aber noch nicht hinreichend bewiesen (FRANZ, 1990).

Lektine in Bakterien dienen der Adhäsion des Bakteriums an die Zielzelle und sind damit Auslöser für den Zielzelleintritt und die Infektion. Die Oberflächenkohlenhydrate einer Zielzelle entscheiden somit, ob eine Infektion stattfindet oder nicht. Auch die viralen Lektine ermöglichen durch eine Reaktion mit den Oberflächenkohlenhydraten einer Zelle eine virale Adhäsion und Infektion. Einige Viren verfügen über Lektine in ihren Hämagglutininen, die an Sialinsäure auf den Zelloberflächen der Zielzellen binden. Diese Viren besitzen zusätzlich das Enzym Neuraminidase, welches den Sialinsäurerest an der Zelloberfläche abspaltet und somit die Bindung des Lektins ermöglicht. Hierbei kann sowohl die Zielzelle als auch das virale Lektin die Adhäsion ermöglichen. Dies ist ein wichtiger Aspekt in der Pharmakologie und Arzneimittelentwicklung, da Arzneimittel mit bestimmten Kohlenhydratderivaten eine höhere Affinität bzw. Bindung zu Krankheitserregern haben (FRANZ, 1990; GABIUS, 2009).

AMINOFF et al. (1950) fanden durch verschiedene Untersuchungen heraus, dass sich spezifische Zucker an Zelloberflächen befinden. Es wurde schon früh die Möglichkeit gesehen, diese Zucker als Identitätsmarker für Zellen zu verwenden (SHARON & LIS, 2004). Mit weiterer Entwicklung der Glykobiologie und der Kenntnisse um die (zuckerbindenden-) Eigenschaften der Lektine sind sie heutzutage zu wichtigen Werkzeugen in Biochemie, Histochemie und klinischer Diagnostik geworden (FRANZ, 1990). Auf Grund ihrer Fähigkeit selektiv Glykanepitope zu binden werden pflanzliche Lektine häufig im Labor für das sogenannte „Glycophenotyping“ (Glykananalyse) verwendet (GABIUS, 2009).

Veränderungen in der Zucker-Oberflächenstruktur einer Zelle können mit der Entstehung von Krebs assoziiert sein und Lektine können durch ihre Bindungseigenschaften als Marker für maligne Zellen eingesetzt werden (GABIUS & GABIUS, 1997; SHARON & LIS, 2004).

In der Lektinhistochemie werden die Lektine zur besseren Kenntnis von Membranstrukturen, Charakterisierungen bestimmter Zelltypen und der Veränderungen des Glykokonjugatspektrums im Rahmen von Entwicklungsprozessen und von einer malignen Entartung von Zellen verwendet (FRANZ, 1990).

---

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Pflanzenlektine eingesetzt, um genauere Informationen über die Zuckerzusammensetzung der Glykokongulate der bovinen Euterhaut zu erhalten.

### III. MATERIAL UND METHODEN

Bei den in diesem Kapitel genannten Versuchsprotokollen handelt es sich meist um Standardprotokolle des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU München, die modifizierte Verfahren nach ROMEIS (2010) darstellen.

#### 1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial für diese Arbeit dienten Euterhautproben, entnommen an fünf verschiedenen Lokalisationen des Euters von zehn weiblichen Rindern unterschiedlichen Alters (von 24 Monate bis 9 Jahre) der Rasse Fleckvieh. Jeweils fünf der Tiere befanden sich im Laktationsstadium und fünf waren im jungen geschlechtsreifen Stadium ohne vorangegangene Geburt/Laktation (Färsen). Die Herkunft der Tiere ist unbekannt, alle Proben wurden im Schlachthof München gewonnen.

**Tabelle 2: Übersicht über die beprobten Rinder**

Rasse	Alter	Laktationsstadium	Geschlecht	Entnahmedatum
FV	26 Monate	Nicht laktierend	w	August 2011
FV	24 Monate	Nicht laktierend	w	August 2011
FV	26 Monate	Nicht laktierend	w	August 2011
FV	5,6 Jahre	Laktierend	w	August 2011
FV	9 Jahre	Laktierend	w	September 2011
FV	5 Jahre	Laktierend	w	September 2011
FV	8 Jahre	Laktierend	w	September 2011
FV	6 Jahre	Laktierend	w	September 2011
FV	27 Monate	Nicht laktierend	w	September 2011
FV	19 Monate	Nicht laktierend	w	September 2011

Rasse: FV: Fleckvieh, Geschlecht: w: weiblich

Die in diesem Kapitel nicht genauer beschriebenen Puffer, Lösungen, Chemikalien und Arbeitsmaterialien werden im „Kapitel XI. Anhang“ näher erläutert.

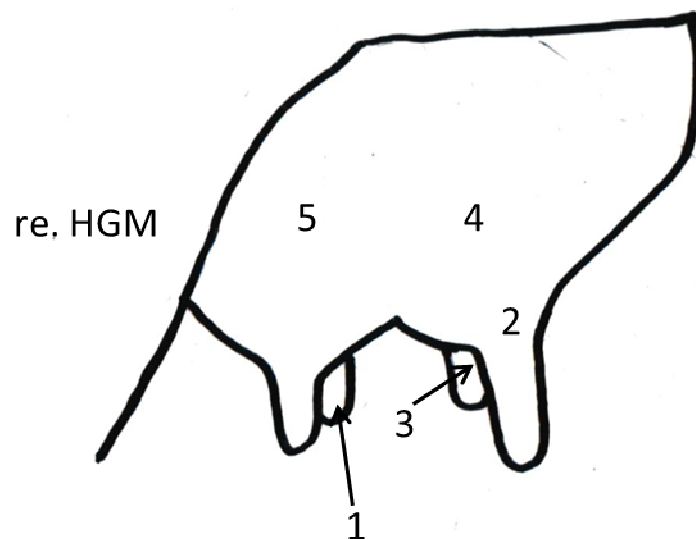
#### 2. Gewinnung und Präparation der Euterhautproben

Die Euterhautproben wurden unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere entnommen und wiesen adspektorisch und palpatorisch keinerlei pathologische Veränderungen auf. Es wurde mit einem Messer und einer atraumatischen Pinzette an fünf festgelegten Lokalisationen (Zitzenspitze der linken hinteren Zitze, laterale und mediale Zitzenbasis der linken hinteren Zitze, rechte laterale Euterhaut des



Vorderviertels, linke laterale Euterhaut des Hinterviertels) ein ca. 3x2cm großes rechteckiges Hautstück abpräpariert. Dabei wurde das jeweilige Hautareal möglichst tief vom restlichen Gewebe getrennt. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Entnahmestellen der Hautproben am bovinen Euter.

**Abb. 2: Skizze der Entnahmestellen der Euterhautproben bei Kühen und Färsen der Rasse Fleckvieh**



**Bezeichnung der Lokalisationen:** 1= Zitzenspitze (linke hintere Zitze), 2= Zitzenbasis lateral (an der linken hinteren Zitze entnommen), 3=Zitzenbasis medial (an der linken hinteren Zitze entnommen), 4= Euterhaut des lateralen Vorderviertels des Euters (rechte Seite entnommen), 5= Euterhaut des lateralen Hinterviertels des Euters (linke Seite entnommen); re: rechts, HGM: Hintergliedmaße

### **3. Fixierung und Materialvorbereitung für die Lichtmikroskopie**

Die gewonnenen Euterhautproben wurden mit Hilfe eines Skalpell in zwei bzw. drei gleich große Stücke geschnitten. Von allen Tieren wurde jeweils eine Hautprobe pro Lokalisation in Bouin'scher Lösung und eine pro Lokalisation in Formol-Lösung 24 Stunden lang immersionsfixiert. Zusätzlich wurden von vier Tieren mehrere Hautproben für die Fixierlösung nach Karnovsky zugeschnitten. Die maximale Gewebegröße hierfür betrug  $3 \times 3 \text{ mm}^2$ . Zwischen der Entnahme der Euterhautproben und der Verbringung der letzten Probe in das Fixans verging maximal eine halbe Stunde. Die in Bouin'scher Lösung fixierten Proben wurden nach 24

Stunden mit 70% Ethanol gespült und verblieben insgesamt 72 Stunden in diesem Reagenz. In dieser Zeit fand ein zweimaliger Wechsel in frisches 70%-iges Ethanol statt. Nach dieser ersten Fixierungsstufe wurden die Proben passend und gerade zugeschnitten, sodass mindestens zwei bouinfixierte Proben pro Tier und Lokalisation vorhanden waren. Anschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x Ethanol 80%, 2 x Ethanol 96%, 2 x Isopropanol, 3 x Xylol) weiter entwässert und in Paraplast® (Fa. Monoject Scientific Inc., Kildare, Ireland) eingebettet. Die Einbettung erfolgte über 22 Stunden in einem Einbettungsautomaten (Duplex Processor®, Fa. Shandon (Frankfurt am Main)). Die mit Paraplast® durchtränkten Proben wurden danach mit Hilfe eines Histostat-Tissue-Embedding Centers (EG 1140H, Leica (Rockville, USA)) einzeln in gleich große Paraplast®-Blöcke ausgegossen und über einen Zeitraum von einer Stunde auf einer Kühlplatte abgekühlt. Nach Entfernung der Paraplastformen wurden von jedem Block unter Verwendung eines Rotationsmikrotoms (Typ HM 340E, Microm international, (Walldorf)) 40-50 Schnitte mit einer Schichtdicke von ca. 5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichtete (SuperFrostUltraPlus adhäsiv®, Fisher Scientific, Schwerte) und unbeschichtete (SuperFrost®, Fisher Scientific, Schwerte) Glasobjektträger aufgezogen und für eine vollständige Trocknung über einen Zeitraum von 24 Stunden in einen Wärmeschrank (40°C) verbracht.

Die Formol fixierten Proben wurden 4 und 28 Stunden nach der Erstfixierung nochmals in frisches Formol verbracht. Nach einer weiteren 24-stündigen Fixierungsphase wurden die Proben ähnlich den Bouin fixierten Proben zugeschnitten und für einen Zeitraum von zwei Stunden in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gespült. Dieses wurde während der Spülzeit dreimal gewechselt. Anschließend wurden die Proben in 70% Ethanol verbracht und drei Stunden später in den Einbettungsautomaten (Citadel 2000, Shandon, (Frankfurt am Main)) (2 x Ethanol 80%, 2 x Ethanol 96%, 3 x Isopropanol, 3 x Xylol, 2 x Paraplast) eingelegt. Die weiteren Schritte bis zur Entstehung der Paraplastschnitte entsprachen der Vorgehensweise bei den Bouin fixierten Proben. Die fertigen Schnitte wurden für die konventionellen histologischen, glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen verwendet.

## 4. Konventionelle histologische Färbungen

Allen hier im Detail beschriebenen histologischen Färbungen ist eine Vorbehandlung der Schnitte durch Entparaffinierung und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 10 min Xylol, 2 x 5 sek Isopropanol, 1 x 5 sek 96% Ethanol, 1 x 5 sek 70% Ethanol) gemein.

Anschließend an die jeweilige Färbemethode wurden alle Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt® (Quick Hardening Mounting Medium Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) und einem dünnen Deckglas (Fa. Menzel, Braunschweig) eingedeckelt und damit langfristig haltbar gemacht.

Zur Bestimmung der Epidermisdicke wurden konventionell gefärbte Gewebeschnitte aller fünf Euterlokalisationen von Färsen und Kühen verwendet. Hierbei wurde der senkrechte Abstand zwischen der Basalmembran und dem Stratum corneum zwischen zwei Papillen des Papillarkörpers in Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) gemessen.

### 4.1. Hämalun-Eosin (H.E.) nach Meier:

Ergebnis: die Zellkerne färben sich blauviolett, das übrige Gewebe stellt sich rosa-rot dar (ROMEIS, 2010). Es wurde als Übersicht von allen Tieren und von jeder Lokalisation jeweils ein Formol fixierter unbeschichteter Schnitt verwendet.

#### Färbeprotokoll:

1. Aqua dest.	5 sek
2. Kernfärbung mit Hämalun	20 min
3. Aqua dest.	5 sek
4. Bläuen in fließendem Leitungswasser	20 min
5. Eosin	10 min
6. Aqua dest.	10 sek

### 4.2. Alcianblau:

Ergebnis: Alcianblau mit einem pH-Wert von 2,5 färbt saure Mukosubstanzen leuchtend blau an. Durch ein Gegenfärben mit Kernechtrot erhalten die Zellkerne eine hellrote Farbe und der Hintergrund färbt sich zartrosa. Um bei den angefärbten Mukosubstanzen zwischen Sulfat- und Karboxylgruppen unterscheiden zu können, wird die Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 1,0 wiederholt. Bei pH 1,0 färben sich nur die sulfatierten Mukosubstanzen leuchtend blau an (ROMEIS, 2010).

### Anfärbung saurer Mukosubstanzen (pH-Wert 2,5)

#### Färbeprotokoll:

1. Aqua dest.	5 sek
2. 3% Essigsäure	3 min
3. 1% Alcianblau (in 3% Essigsäure, pH 2,5)	30 min
4. 3% Essigsäure	5 sek
5. Aqua dest.	5 sek
6. Kernechtrot	4 min
7. Aqua dest.	5 sek

### Anfärbung sulfatierter Mukosubstanzen (pH-Wert 1,0)

#### Färbeprotokoll:

1. Aqua dest.	5 sek
2. 0,1N Salzsäure	3 min
3. 1% Alcianblau (in 0,1N Salzsäure, pH 1,0)	30 min
4. 0,1N Salzsäure	5 sek
5. Aqua dest.	5 sek
6. Kernechtrot	4 min
7. Aqua dest.	5 sek

### 4.3. Trichromfärbung nach Masson und Goldner:

Ergebnis: Die Zellkerne färben sich durch das Eisenhämatoxilin nach Weigert braunschwarz und das Zytoplasma ist ziegelrot. Die Erythrozyten nehmen eine gelb-orange, das Bindegewebe und die Mukosubstanzen eine grüne Farbe an (ROMEIS, 2010).

#### Färbeprotokoll:

1. Aqua dest.	5 sek
2. Eisenhämatoxilin nach Weigert	1 min
3. Aqua dest.	3 x 5 sek
4. fließendes Leitungswasser	10 min
5. Azophloxin	5 min
6. 1% Essigsäure	10 sek
7. Phosphormolybdänsäure-Orange	15 sek- 30 min *
8. 1% Essigsäure	10 sek
9. Lichtgrün	4 min- 5,5 min *
10. 1% Essigsäure	10 sek

\* Unterschiedlich schnelle Reaktionen, lichtmikroskopische Kontrollen notwendig

#### 4.4. Periodic-Acid-Schiff-Reaction (PAS) nach Mc Manus:

Ergebnis: Komplexe Kohlenhydrate stellen sich rosa bis violettrot dar. Die Glykole werden durch die Perjodsäure oxidiert und es entstehen Aldehydgruppen. Diese bilden mit der Schiff'schen Reagenz rosarote Farbkomplexe. Die PAS-Reaktion wurde sowohl mit als auch ohne Amylasevorbehandlung durchgeführt. Bei der Verwendung von Amylase kommt es zur Verdauung von Glykogen und dieses kann demnach nicht an einer positiven Reaktion beteiligt sein. Somit dient es als Kontrolle für die Kohlenhydratspezifität (ROMEIS, 2010).

##### Färbeprotokoll:

1. Aqua dest.	5 sek
2. 0,5% Amylase*	10 min bei 37°C (Brutschrank)
3. Aqua dest.*	5 sek
4. 0,5% wässrige Perjodsäure	5 min
5. Aqua dest.	5 sek
6. Schiff'sches Reagenz	15 min
7. SO <sub>2</sub> -Wasser	3 x 2 min
8. Leitungswasser fließend	5 min
9. Hämalun	4 min
10. Leitungswasser fließend	15 min

\*Schritt 2 und 3 nur bei Amylasevorbehandlung, ansonsten gleich Schritt 4

#### 4.5. Resorcin-Fuchsin-van-Gieson-Färbung:

Ergebnis: Elastische Fasern stellen sich durch das Eisenhämatoxylin nach Weigert blau-schwarz dar. Die Zellkerne zeigen eine dunkelbraune Färbung. Das Muskelgewebe färbt sich gelb und das kollagene Bindegewebe leuchtend rot an.

##### Färbeprotokoll:

1. Resorcinfuchsinlösung	15 – 30 min
2. Leitungswasser fließend	1 min
3. Eisenhämatoxylin (Weigert)	2 - 3 min
4. Aqua dest.	3 x 5 sek
5. Leitungswasser fließend	10 min
6. Pikrinsäure-Thiazinrot	5 min
7. Aqua dest.	5 sek
8. 96% Alkohol	2 x 15 sek -3 min*
9. Isopropanol	2 x 5 sek

\*Kontrolle unterm Mikroskop, Resorcinfuchsin gefärbte Fasern müssen gut zu sehen sein

## 5. Glykohistochemische Untersuchungen

Für die Lektinhistochemie zum Nachweis spezifischer Kohlenhydratstrukturen in Geweben wurden überwiegend Bouin fixierte Schnitte verwendet. Die Untersuchung wurde mit 16 Fluoreszein-Isothiocyant (FITC) konjugierten Lektinen durchgeführt, von denen drei mit Biotin konjugiert waren (MAL-1, SNA, SJA). Die Lektine wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml angewendet und es wurde je eine Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um ein ähnliches Gewebe, bei dem das Lektin bekanntermaßen bindet. Die Negativkontrolle wurde durchgeführt, um eine Eigenfluoreszenz des Euterhautgewebes auszuschließen. Hierbei wurde der Schnitt statt mit einem markierten Lektin mit PBS-Puffer inkubiert.

Zur Verifizierung der Zuckerspezifität wurden die eindeutig positiven Lektine (WGA, s-WGA, ConA, GSL-1, PSA, SNA<sub>bio</sub>) mit einem Hemmzucker vorbehandelt um eine kompetitive Hemmung zu erreichen. Hierfür wurde das entsprechende Lektin 30 bis 60 min (WGA und s-WGA 30 min, die restlichen Lektine 60 min) lang im Dunkeln mit seinem in PBS-Puffer gelösten korrespondierenden Hemmzucker (s. Tabelle 3) inkubiert und danach auf je zwei Gewebeschnitte aufgetragen. Das weitere Procedere entsprach dem normalen Lektinversuchsprotokoll (siehe Seite 22).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Einteilung, Herkunft und die korrespondierenden Hemmzucker der verwendeten Lektine nach ihrer Zuckerspezifität (GOLDSTEIN& PORETZ (1986) modifiziert nach GABIUS (2009), LOHR et al. (2010) GABIUS (2011a) und GABIUS et al. (2011b).

**Tabelle 3: Einteilung und Herkunft der verwendeten Lektine**

Lektingruppe/ Zuckerspezifität	Lektin	Herkunft	Hemm- zucker
Gruppe 1: D-Glucose bzw. D-Mannose bindende Lektine	Con A	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertboh- ne)	M- $\alpha$ -M
	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Linse)	M- $\alpha$ -M
	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Gartenbohne)	M- $\alpha$ -M
Gruppe 2: D-Galactose bindende Lektine	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)	M- $\alpha$ -gal
	PNA	<i>Peanut</i> (Erdnuss)	M- $\alpha$ -gal
	GSL-1	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	M- $\alpha$ -gal
Gruppe 3: N-Acetyl-D- Galactosamin <sup>1</sup> /D- Galactose <sup>2</sup> bindende Lek- tine	DBA <sup>1</sup>	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pfer- debohne)	GalNAc
	SBA <sup>1</sup>	<i>Soybean</i> (Sojabohne)	GalNAc
	SJAbio <sup>1</sup>	<i>Sophora japonica</i> (Japanischer Schnurbaum)	GalNAc
	SNAbio <sup>1,2</sup>	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holun- der)	GalNAc
Gruppe 4: N-Acetyl-D- Glucosamin <sup>3</sup> /N-Acetyl- Neuraminsäure <sup>4</sup> bindende Lektine	WGA <sup>3,4</sup>	<i>Wheat germ</i> (Weizen-Keim)	Chitin-H
	s-WGA <sup>3</sup>	<i>succinyliertes Wheat germ</i> (Weizen- Keim)	Chitin-H
Gruppe 5: L-Fukose bin- dende Lektine	UEA-1	<i>Ulex europaeus</i> (Europäischer Stech- ginster)	Fuc
Gruppe 6: Lektine mit Oligosaccharidbindungs- stellen	MAL-1bio	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	
	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Rote Kid- neybohne)	
	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Rote Kid- neybohne)	

Lektin: bio: biotinyliert, Hemmzucker: Fuc: desulfatiertes Fucoidan 50mM (Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen) Chitin-H: Chitin-Hydrolysate (Vector, Burlingame, USA), 1:4 verdünnt; GalNAc: N-Acetyl-Galactosamin 200mM (Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen); M- $\alpha$ -gal: Methyl- $\alpha$ -D-Galactopyranoside 200mM (Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen); M- $\alpha$ -M: Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside 200mM (E-Y Labs, San Mateo, USA).

Alle Gewebeschnitte wurden den folgenden Versuchsprotokollen unterzogen:

1.) Biotinylierte Lektine (MAL-1, SJA, SNA):

1. Absteigende Alkoholreihe:	
→ Xylol	2 x 30 min
→ Isopropanol	2 x 5 sek
→ 96% Ethanol	5 sek
→ 70% Ethanol	5 sek
→ Aqua dest.	2 x 5 min
2. PBS (pH 7,4- 7,5)	3 x 5 min
3. Dako Protein Block Serum Free	10 min
4. Lektinverdünnung (2,5µl Lektin/1ml PBS)	60 min/RT in FK; 100µl/Schnitt
5. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
6. FITC markiertes Streptavidin	30 min*
7. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
8. Eindeckeln mit Gel-Mount/Vectorshield mit DAPI und anschließende Aufbewahrung im Kühlschrank	

2.) FITC markierte Lektine (alle übrigen):

1. Absteigende Alkoholreihe (siehe oben)	
2. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
3. Lektinverdünnung (2,5µl FITC markiertes Lektin/ 1ml PBS-Puffer) 100µl/Schnitt	60 min/RT in FK*
4. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
5. Eindeckeln mit Gel-Mount/Vectorshield mit DAPI und anschließende Aufbewahrung im Kühlschrank	

\* ab diesem Schritt wurde im Dunkeln gearbeitet, um ein vorzeitiges Abschwächen der Fluoreszenz zu vermeiden, RT: Raumtemperatur, FK: Feuchtkammer, PBS: Phosphatpuffer

Auswertung: Die glykohistochemisch aufbereiteten Schnitte wurden spätestens drei Wochen nach Herstellung ausgewertet, um ein Verblässen der Fluoreszenz zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte an einem Auflichtfluoreszenzmikroskop Dialux 20® (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) mit angeschlossener ProgRes® Kamera (Fa. Jenoptik, Jena).



## **6. Immunhistochemische Untersuchungen**

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden ausschließlich mit Bouin fixierten Schnitten durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es bestimmte Antigene nach der ABC („Avidin-Biotin-Complex“-) Methode im Euterhautgewebe nachzuweisen (MULISCH & WELSCH, 2010). Bei jedem Versuchsdurchlauf eines Antigens wurden zur besseren Auswertbarkeit eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. Die Negativkontrolle wurde statt mit dem Primärantikörper mit einer Verdünnungslösung (Antibody Diluent with Background-Reducing Components, Dako, Hamburg) behandelt. Die übrigen Arbeitsschritte entsprachen denen der anderen Schnitte. Für die Positivkontrolle wurde ein Gewebeschnitt ausgewählt, der eine spezifische positive Antigen/Antikörper-Reaktion erwarten ließ.

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper, Verdünnungen, Inkubationszeiten, Herkunft der Primär- und Sekundärantikörper, Vorbehandlungen**

Primär-AK	AK-liefernde Tierart	Verdünnung/ Inkubationszeit	Hersteller	Sekundär-AK	Verdünnung/ Inkubationszeit	Vorbehandlung
Laminin	Kaninchen	1:500/ 20h bei 6°C	Fa. Sero-tec, Oxford, UK	Anti-Kaninchen IgG biot. vom Schwein	1:300/ 30 min RT	0,1% Protease/ 10 min RT
Vimentin	Maus	1:500/ 20h bei 6°C	Dako, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300/ 30 min RT	0,1% Protease/ 10 min RT
$\alpha$ -SMA	Maus	1:40/ 1h bei RT	Fa. Dako, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300/ 30 min RT	
COX-1	Kaninchen	1:250/ 20h bei 6°C	Fa. Abcam, Cambridge, UK	Anti-Kaninchen IgG biot. vom Schwein	1:300/ 30 min RT	Citratpuffer pH 6,1, 3x10 min Mikrowelle
COX-2	Ziege	1:400/ 20h bei 6°C	Fa. Abcam, Cambridge, UK	Anti-Goat IgG biot. vom Kaninchen	1:400/ 30 min RT	
GFAP	Kaninchen	1:100/ 20h bei 6°C	Fa. Dako, Hamburg	Anti-Kaninchen IgG biot. vom Schwein	1:300/ 30 min RT	
Desmin	Maus	1:200/ 20h bei 6°C	Fa. Gene Tex, Taiwan, R.O.C.	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300/ 30 min RT	
Kollagen-1	Maus	1:500/ 20h bei 6°C	Fa. Abcam, Cambridge, UK	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300/ 30 min RT	Citratpuffer pH 6,1, 3x10 min Mikrowelle
Pancytokerin	Maus	1:100/ 20h bei 6°C	Fa. Biocarta, Hamburg	Anti-Maus IgG biot. vom Kaninchen	1:300/ 30 min RT	Trypsin (158)/ 20 min RT

AK: Antikörper, Sekundärantikörper: biot.: biotinyliert, Inkubationszeit: RT: Raumtemperatur, min.: Minuten, h.: Stunden

Die Gewebeschnitte wurden für die Immunhistochemie folgendem Versuchsprotokoll unterzogen:

1. Absteigende Alkoholreihe	siehe histologische Färbungen
2. Aqua dest.	2 x 5 min
3. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
4. Vorbehandlung	siehe Tabelle 4
5. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
6. Hydrogenperoxidlösung	10 min
7. Leitungswasser fließend	10 min
8. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
9. Protein Block Serum-Free (Dako, Carpinteria, USA)	10 min
10. Primärantikörper verdünnt in Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, USA)	s. Tabelle 4
11. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
12. Sekundärantikörper	s. Tabelle 4
13. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
14. Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Complex (Dako)	30 min
15. PBS (pH 7,4-7,5)	3 x 5 min
16. DAB-Hydrogenperoxidlösung	8 min
17. Leitungswasser fließend	1-2 min
18. Kernfärbung mit Hämalaun	30 sek
19. Leitungswasser fließend	10 min
20. Aufsteigende Alkoholreihe	siehe histologische Färbungen
21. Eindecken mit Eukitt®	

## 7. Elektronenmikroskopie

Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden mit einer Skalpellklinge und einer atraumatischen Pinzette in ca. 1x1x1mm große Probenstücke geteilt und direkt in das Fixiermedium nach Karnovsky verbracht. Die zwei Hauptkomponenten des Mediums (Formaldehyd und Glutaraldehyd) wurden erst unmittelbar vor Verwendung miteinander vermischt.

Nach folgendem Versuchsprotokoll wurden die Proben weiterverarbeitet:

1. Fixierung der Proben in Karnovsky-Medium bei 4°C für 24h
2. Spülen der Proben (3 x 60 min) in Natriumcacodylatpuffer (0,1M, pH-Wert 7,2)
3. Vorkontrastierung in Osmiumtetroxid(1%) und Kaliumferrocyanid (1,5%) bei 4°C für 2h
4. Spülen der Proben (3 x 20 min) in Natriumcacodylatpuffer (0,1M, pH-Wert 7,2)
5. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe: 30%, 50%, 70%, 90% Ethanol jeweils 30 min, 3 x 30 min Ethanol absolut
6. Einbettung in Epon: 2 x 15 min Propylenoxid, 1h Propylen:Epon (2:1), 24h Propylen:Epon (1:1), 1h in reinem Epon
7. Verbringen der Proben in flache Einbettungsgießformen
8. Polymerisierung der Proben für 48h im Wärmeschrank (60°C)
9. Anfertigung von Semidünnschnitten (Dicke: 1µm) mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultra-Cut E®, Reichert-Jung, Wien) und anschließende Färbung mit Methylenblau nach Richardson
10. Auswahl geeigneter Bereiche und Anfertigung von 60 nm-Ultradünnschnitten mit Hilfe eines Diamantmessers (Diatom)
11. Auffangen der Ultradünnschnitte mit Kupfernetzchen (150 mesh, Plano, Wetzlar)
12. Nachkontrastierung: Uranylacetat 2% für 10 min und Bleicitratlösung nach Reynolds für 3 min

Die Auswertung und fotografische Dokumentation der Ultradünnschnitte wurde mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Fa. Zeiss, Jena) durchgeführt.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Ergebnisse der konventionellen histologischen Färbungen**

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende histologische und histochemische Färbungen durchgeführt und ausgewertet: Hämalaun-Eosin-Färbung (HE), Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0, Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) mit und ohne Amylasevorbehandlung, Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner und Resorcin-Fuchsin-van-Gieson-Färbung.

Der histologische Aufbau der Euterhaut ist bei den untersuchten Färsen und Kühen der Rasse Fleckvieh identisch. Der einzige zu beobachtende morphologische Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist eine unterschiedliche Epidermisdicke. Die Epidermis der Färsen (Epidermisdicke: 100 – 330  $\mu\text{m}$ ) ist im Schnitt dünner als die der laktierenden Kühe (Epidermisdicke: 180 – 380  $\mu\text{m}$ ).

#### **1.1. Übersicht über den Aufbau der Epidermis der bovinen Euterhaut**

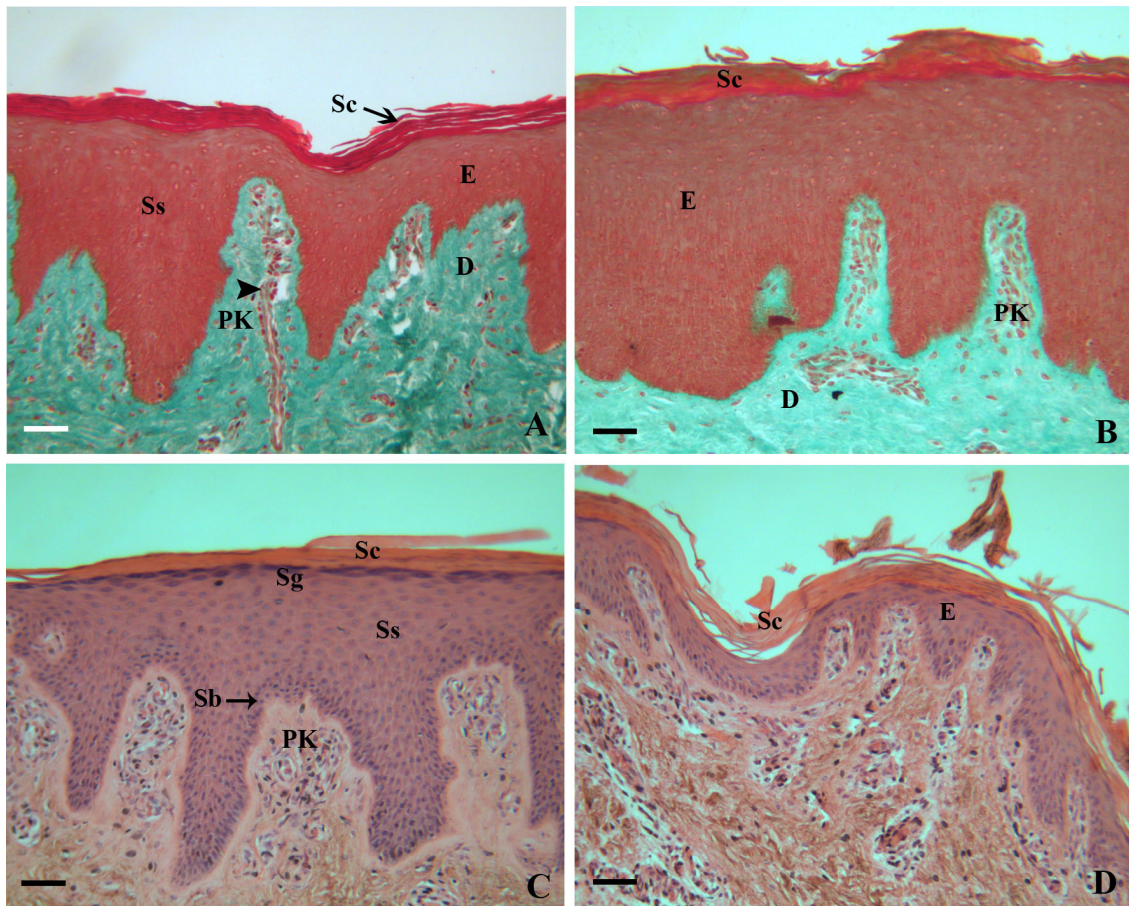
Die Epidermis der Euterhaut der untersuchten Färsen und Kühe zeigt einen vierschichtigen Aufbau aus Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Ein Stratum lucidum ist nicht vorhanden. In der Epidermis gibt es keine Haare und Drüsen. Das Stratum basale ist einschichtig und liegt der Basalmembran auf. Die Basalmembran färbt sich in der PAS-Reaktion schwach bis mittel positiv und stellt sich in der Resorcin-Fuchsin-van-Gieson-Färbung leuchtend rot dar (Abbildung 6: B und D). Die Zellen des Stratum basale zeigen eine meist hochprismatische Form mit einem vertikal ausgerichteten Zellkern. Das darauffolgende Str. spinosum ist je nach Lokalisation und Alter des Tieres aus unterschiedlich vielen Schichten aufgebaut und mindestens dreischichtig. Die Haut der Zitzenspitze und der Zitzenbasis der laktierenden Kühe zeigt ein stark ausgeprägtes Stratum spinosum mit vielen Zelllagen. Die wenigsten Zelllagen konnten bei der seitlichen Euterhaut der Färsen beobachtet werden. Die Zellen des Stratum spinosum stellen sich polymorph dar.

Das Stratum granulosum besteht aus ein bis zwei Schichten abgeflachter Zellen mit basophiler Granula im Zytoplasma. Die Epidermis wird durch das Stratum corneum abgeschlossen. Dieses besteht aus einem fest mit dem Stratum granulosum verbundenen Anteil und in manchen apikalen Bereichen ist es abgeschilfert (Abbildung 3). Es gibt keine Unterschiede des Stratum corneums bei behaarten oder haarlosen Hautarea-

len des Euters. Mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten keine Melanozyten oder andere freie Zellen in der Epidermis identifiziert werden.

Die Epidermis ist an der Zitze am dicksten (Epidermisdicke: 300 – 380  $\mu\text{m}$  (senkrechter Abstand zwischen der Basalmembran und dem Stratum corneum zwischen zwei Papillen des Papillarkörpers)) (Abbildung 3: C). Ihre Dicke nimmt an der seitlichen Haut des Euterkörpers deutlich ab (Epidermisdicke: 70 – 210  $\mu\text{m}$ ). Wie schon oben beschrieben, ist die Epidermis der Kühe im Schnitt dicker als die der Färsen (Abbildung 3: A und B).

**Abb. 3: Darstellung der Epidermisdicke der bovinen Euterhaut von Kühen und Färsen**



Darstellung der Unterschiede der Epidermisdicke von verschiedenen Lokalisationen (Zitzen spitze (Bild C) und seitliche Euterhaut des Vorderviertels (Bild D)) und verschiedenen Altersgruppen (Färsen (Bild A) vs. Kuh (Bild B)).

**A: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Trichrom, Stratum corneum (Sc) gut abgrenzbar, Stratum spinosum (Ss) der Epidermis (E) mehrschichtig, Papillarkörper (PK) der Dermis (D) stark ausgeprägt und mit vielen freien Zellen (Pfeilspitze), Epidermisdicke (senkrechter Abstand zwischen der Basalmembran und dem Stratum corneum zwischen zwei Papillen des Papillarkörpers): 330 µm, SB: 50µm;

**B: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Trichrom, Epidermis (D) deutlich dicker als in Bild A (Epidermisdicke: 370 µm), Papillarkörper (PK) ähnlich stark ausgeprägt, Sc: Stratum corneum, E: Epidermis, SB: 50µm;

**C: Kuh, 4 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** HE, Stratum corneum (Sc) teilweise abgeschilfert, Stratum granulosum (Sg) besteht aus ein bis zwei Zellschichten, Zellen sind abgeflacht und haben basophile Granula, Stratum spinosum (Ss) besteht aus vielen Zellschichten, einschichtiges Stratum basale (Sb mit Pfeil) mit hochprismatischen Zellen und Zellkernen mit vertikaler Ausrichtung, Papillarkörper (PK) sehr deutlich und mit kleinen Kapillaren und vielen freien Zellen, SB: 50µm;

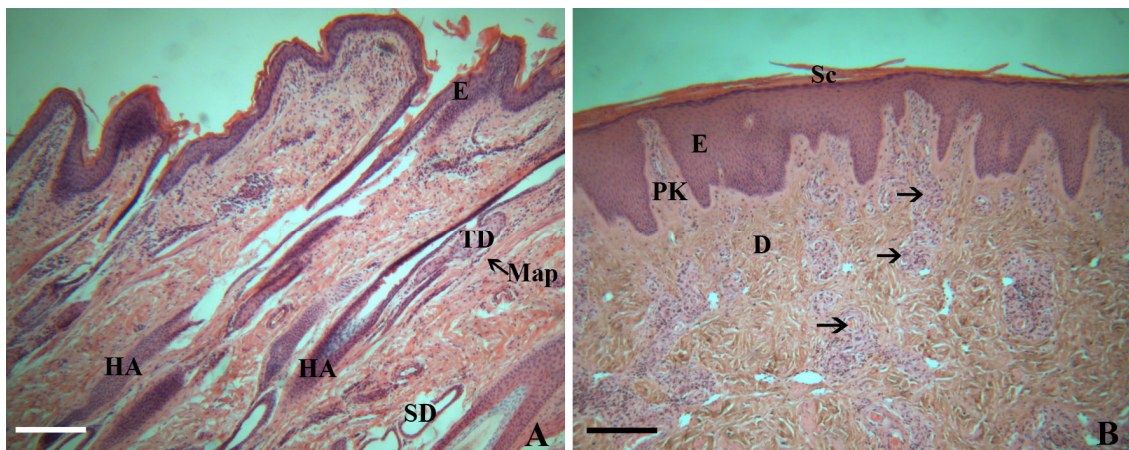
**D: Kuh, 4 Jahre alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels,** HE, Epidermis (E) deutlich dünner als an der Zitzenspitze, Papillarkörper viel flacher ausgeprägt, Sc: Stratum corneum, SB: 50µm;

## 1.2. Übersicht über den Aufbau der Dermis der bovinen Euterhaut

Die Dermis besitzt einen zweiteiligen Aufbau. Direkt unterhalb der Basalmembran der Epidermis liegt das Stratum papillare mit seinen unterschiedlich stark ausgeprägten Papillarkörpern. Die Papillarkörper sind an der Zitzenhaut am höchsten und an der seitlichen Euterhaut relativ flach ausgebildet (Abbildung 3: C und D). Innerhalb und unterhalb des Papillarkörpers liegen viele freie Zellen und Kapillaren (Abbildung 3: A, Pfeilspitze). Mit der Trichrom-, der HE- und der Alzianblau-Färbung (pH 2,5 und 1,0) lassen sich viele freie Zellen im subepithelialen Bindegewebe der Dermis vor allem um die Blutgefäße herum darstellen.

Unterhalb des Stratum papillare schließt sich das Stratum reticulare an. Diese Schicht ist durch viele Bindegewebsfasern, Muskelstränge, Haare, Blutgefäße, Schweiß- und Talgdrüsen charakterisiert. Die Dermis der Zitzenspitze und inneren Zitzenbasis ist komplett haar- und drüsenlos. Eine vergleichende Darstellung behaarter und unbehaarter Euterhaut ist in Abbildung 4 dargestellt.

**Abb.4: Bovine Euterhaut der Zitze und des Euterkörpers**



Vergleichende Übersicht über behaarte und unbehaarte Areale der bovinen Euterhaut.

**A: Färse, 24 Monate alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels, HE,** behaarte Haut des Euterkörpers, Epidermis (E) vergleichsweise schmal (ca. 100 µm), viele einzelne Haare (HA) in der Dermis, Musculus arrector pili (Map) an der Neigungsseite des Haares, einzelne Schweiß- und Talgdrüsen (SD und TD), SB: 200µm;

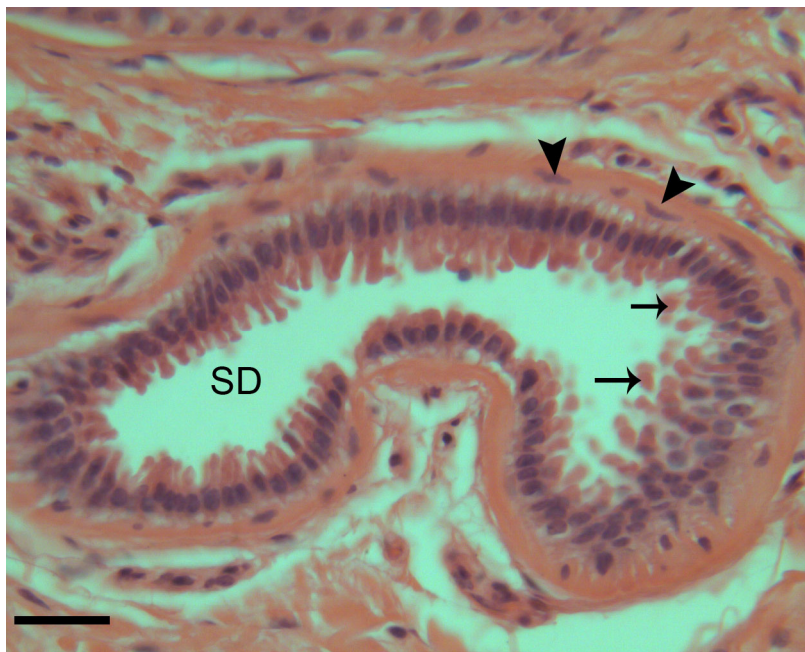
**B: Kuh, 4 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze, HE,** unbehaarte Haut der Zitze, keine Drüsen vorhanden, Stratum corneum (Sc) teilweise abgeschilfert, Epidermis (E) aus vielen Schichten aufgebaut (Epidermisdicke: ca. 330 µm), Papillarkörper (PK) deutlich ausgeprägt, viele Blutgefäße (Pfeile) in der Dermis (D), SB: 200µm;



Die Anordnung der Bindegewebsfasern der Dermis wird in den tieferen Schichten vermehrt gröber und lockerer. Die Haare der Euterhaut liegen stets einzeln und ihre Anzahl zeigt individuelle Schwankungen. Das Haarmark des Haares besteht aus Zellen mit schwach eosinophilem Zytoplasma und im Querschnitt längsovalen Zellkernen. Die umgebende Haarrinde lässt sich gut vom Haarmark differenzieren und ist deutlich keratinisiert. Bei der inneren Haarwurzelscheide lässt sich eine innere Schicht (Huxley-Schicht) von einer äußeren Schicht (Henle-Schicht) unterscheiden. Die Zellen der äußeren Haarwurzelscheide haben eine iso- bis hochprismatische Form, einen runden bis ovalen Zellkern und ein schwach eosinophiles Zytoplasma. Im suprabulbären unteren Bereich fällt auf, dass die Zellen vermehrt eine hochprismatische Form und helleres Zytoplasma besitzen als im oberen Bereich. Die dermale Haarwurzelscheide mit ihrem zwei- bis dreischichtigen Aufbau, zeigt sich ebenso wie die dermale Papille in der Alzianblau-Färbung bei pH 2,5 schwach bis mittelstark positiv und bei pH 1,0 schwach positiv (Abbildung 10: A). Bei der PAS-Reaktion sind die innere, die äußere und die dermale Haarwurzelscheide mittelstark positiv (Abbildung 7: A). Der musculus arrector pili (M.a.p.) ist kräftig ausgebildet und liegt meist auf der Neigungsseite des Haares (Abbildung 4: A). Eine gute Übersicht über den Aufbau der Haare der Euterhaut von Kühen und Färsen gibt Abbildung 10.

In direkter Nähe der Haare befinden sich die Talgdrüsenanlagen, die aus mehreren Drüsenalveolen bestehen. Im Randbereich der Talgdrüsen gibt es viele freie Zellen, die sich mit der HE-Färbung gut darstellen lassen. Die Basalmembran der Talgdrüsen lässt sich mit der PAS-Reaktion schwach positiv darstellen (Abbildung 8: C). Das Talgdrüsenepithel zeigt eine schwach positive Färbung mit Alzianblau bei einem pH-Wert von 2,5 (Abbildung 9: A).

Die Schweißdrüsen mit apokriner Sekretion liegen meist etwas tiefer in der Dermis und besitzen großlumige Endstücke. Das einschichtige Schweißdrüsenepithel liegt einer kräftigen Membrana propria auf. Im basalen Bereich des Drüsenepithels liegen Myoepithelzellen (Abbildung 5).

**Abb. 5: Schweißdrüse der bovinen Euterhaut**

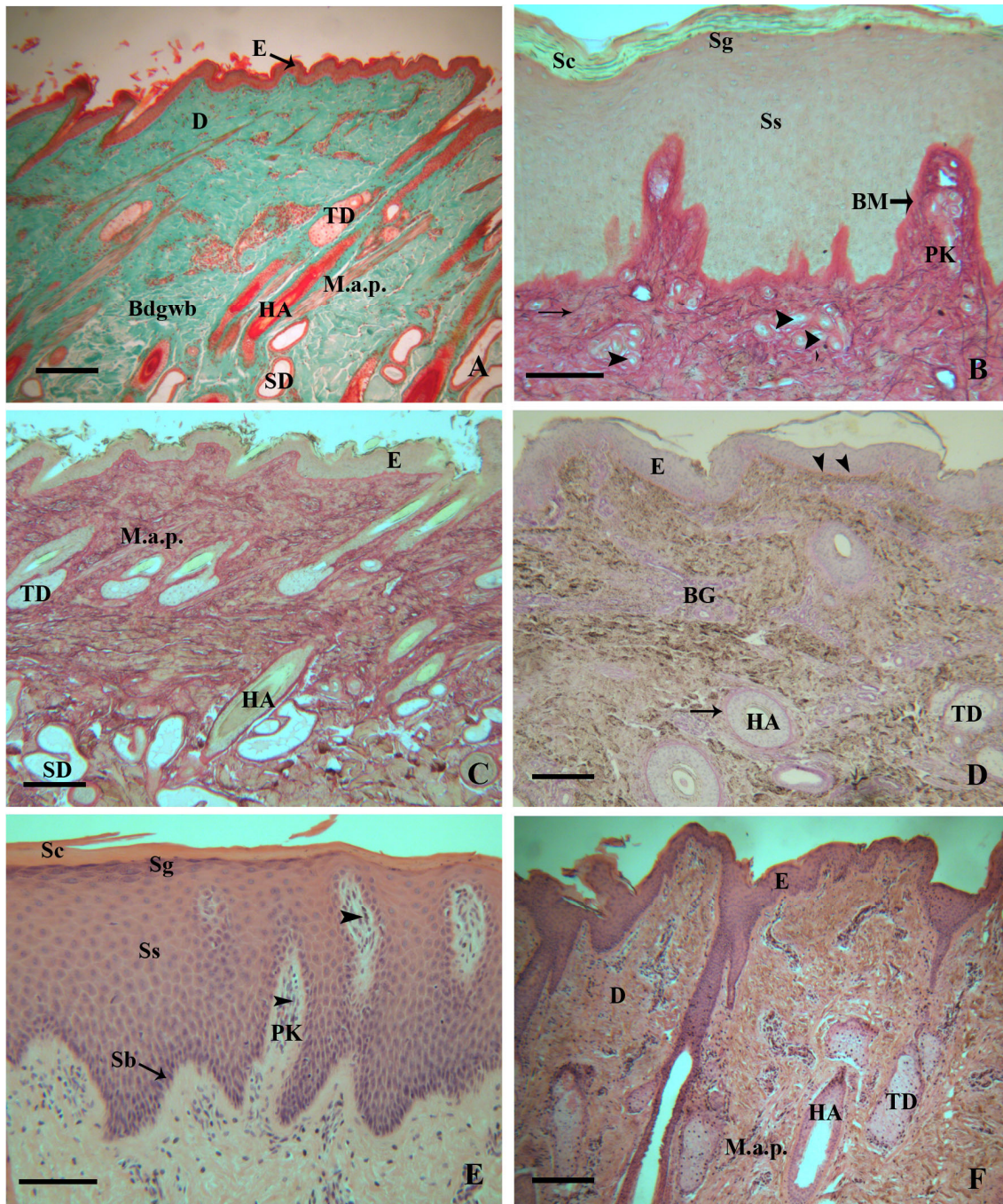
Darstellung einer Schweißdrüse mit apokriner Sekretion.

**Kuh, 5 Jahre alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels, HE, Schweißdrüse (SD) mit apokriner Sekretion (Pfeile), Epithelzellen haben eine hochprismatische Form und einen ovalen Zellkern mit vertikaler Ausrichtung, in den basalen Bereichen des Drüsenepithels liegen Myoepithelzellen (Pfeilspitzen), SB: 25µm;**

Die Schweißdrüsen kommen immer gemeinsam mit Haaren vor und fehlen demnach an der Haut der Zitzenspitze und der inneren Zitzenbasis. Das Sekret der Schweißdrüsen lässt sich mit Alzianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 stark anfärben und ist bei einem pH-Wert von 1,0 negativ (Abbildung 9: C und D). Die Basalmembran der Schweißdrüsen zeigt eine mittelstark positive PAS-Reaktion, das Epithel ist schwach PAS positiv (Abbildung 8: C und D). Zwischen Färsen und Kühen gibt es keine histologischen Unterschiede der Schweißdrüsen.

In der tiefen Dermis lassen sich dickwandige und großlumige Venen beobachten. Vor allem im Bereich der haarlosen Zitzenspitze sind sie in großer Anzahl vorhanden.

An die Dermis schließt sich die Subkutis an. Diese ist jedoch auf Grund ihrer Morphologie nicht eindeutig von der Dermis abzugrenzen.

**Abb. 6: Übersicht über die bovine Euterhaut**

Die Epidermis der bovinen Euterhaut lässt sich gut von der darunter liegenden Dermis abgrenzen. In der Dermis liegen je nach Hautlokalisation unterschiedlich viele Haare mit Schweiß- und Talgdrüsen. Die Schweißdrüsen liegen meist tiefer als die Haare. Es gibt viele subepidermal liegende Kapillaren und viele freie Zellen im Papillarkörper (PK). Der Musculus arrector pili (M.a.p.) ist kräftig ausgebildet.



**A: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Trichrom, Epidermis (E) lässt sich gut von der Dermis (D) abgrenzen, Musculus arrector pili (M.a.p.) ist deutlich ausgeprägt und setzt sich gut vom grün gefärbten Bindegewebe (Bdgwb) ab, Bindegewebsfasern in den tieferen Anteilen der Dermis gröber und lockerer verteilt als im subepidermalen Bereich, Schweißdrüsen (SD) liegen in der tiefen Dermis unterhalb der Haare (HA), SB: 200µm;

**B: Kuh, 9 Jahre alt, Haut der Zitzenspitze,** Resorcin-Fuchsin-van-Gieson, Str. corneum (Sc) gut vom darunter liegenden Str. granulosum (Sg) abgrenzbar, Str. spinosum (Ss) weist viele Zellschichten auf, Basalmembran (BM) färbt sich leuchtend rot an, Pfeilspitzen: viele Kapillaren in subepidermaler Dermis, Papillarkörper (PK) ist deutlich ausgeprägt, einzelner Pfeil: elastische Fasern (schwarz-blau gefärbt) sind zahlreich, SB: 100µm;

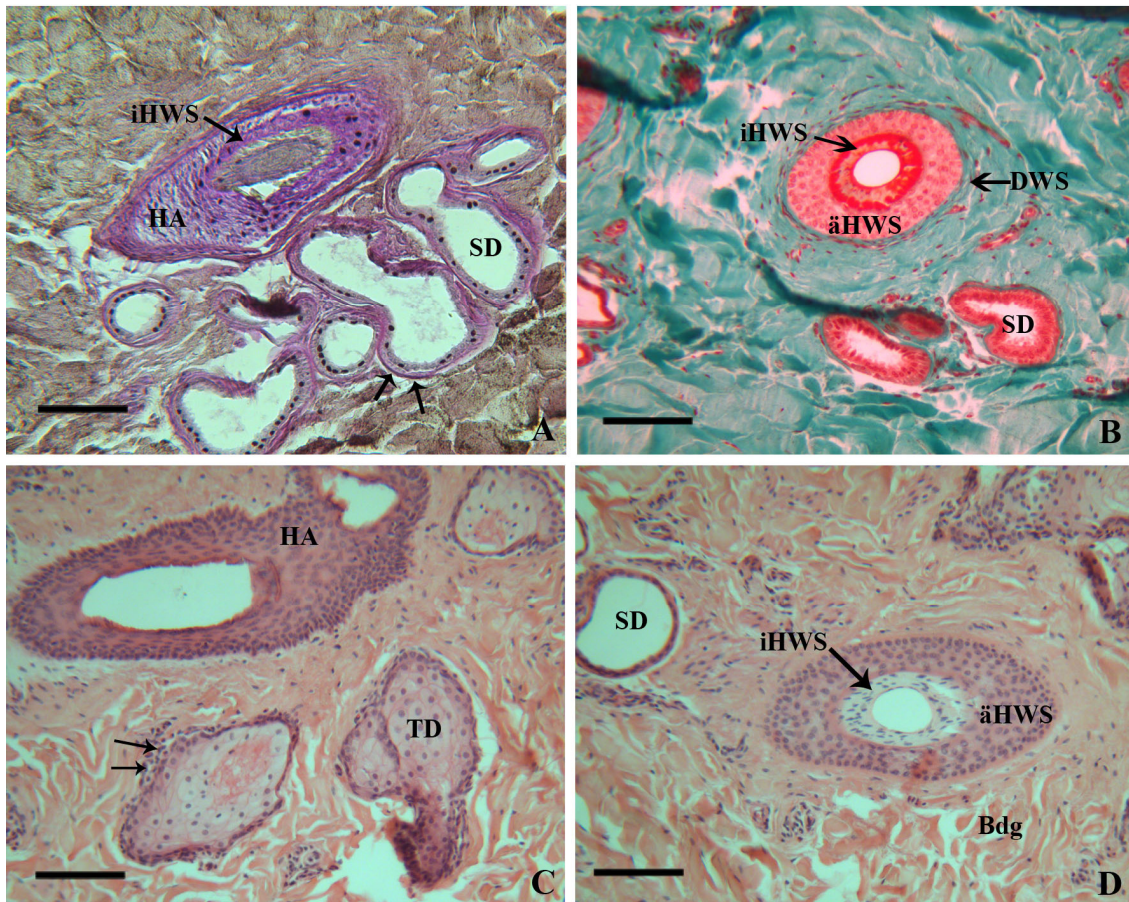
**C: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Resorcin-Fuchsin-van-Gieson, Epidermis (E) dünn, Musculus arrector pili (M.a.p.) kräftig ausgebildet auf der Neigungsseite des Haars, Haare (HA) gemeinsam mit zugehörigen Talg- und Schweißdrüsen (TD, SD), SB: 200µm;

**D: Kuh, 9 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** PAS-Reaktion, Blutgefäße (BG), Basalmembran der Epidermis (E) (Pfeilspitzen), Basalmembran (Pfeil) der Haare (HA) und Basalmembran der Talgdrüse (TD) zeigen eine schwach positive Reaktion, SB: 200µm;

**E: Kuh, 6 Jahre alt, Haut der seitlichen Zitzenbasis,** HE, Epidermis insgesamt recht dick, Zellen im Str. granulosum (Sg) abgeflacht, Zellkern mit Längsausrichtung, charakteristische basophile Granula in den Zellen, Str. spinosum (Ss) mit bis zu 16 Zellschichten, Str. basale (Sb) einschichtig mit hochprismatischen Zellen und stark basophilem Zellkern, ausgeprägter Papillarkörper (PK) mit vielen Zellen mit basophilem Zellkern (Pfeilspitzen), Sc: Stratum corneum, SB: 100µm

**F: Färse, 26 Monate alt, Haut der seitlichen Zitzenbasis,** HE, Epidermis (E) deutlich schmaler, in Dermis (D) einzelne Haare (HA) mit ihren Talgdrüsen (TD), Musculus arrector pili (M.a.p.) deutlich abgrenzbar an der Neigungsseite des Haars, SB: 200µm

**Abb. 7: Haaranlagen in der Dermis der bovinen Euterhaut der Zitzenbasis einer 26 Monate alten Färse**



In der Dermis der Zitzenbasis liegen einzelne Haare mit ihren Schweiß- und Talgdrüsen. Die umgebenden kollagenen Bindegewebsfasern des Stratum reticulare sind locker verteilt. Die PAS-Reaktion zeigt eine stark positive Reaktion der Haaranlage und der Basalmembran der Schweißdrüsen.

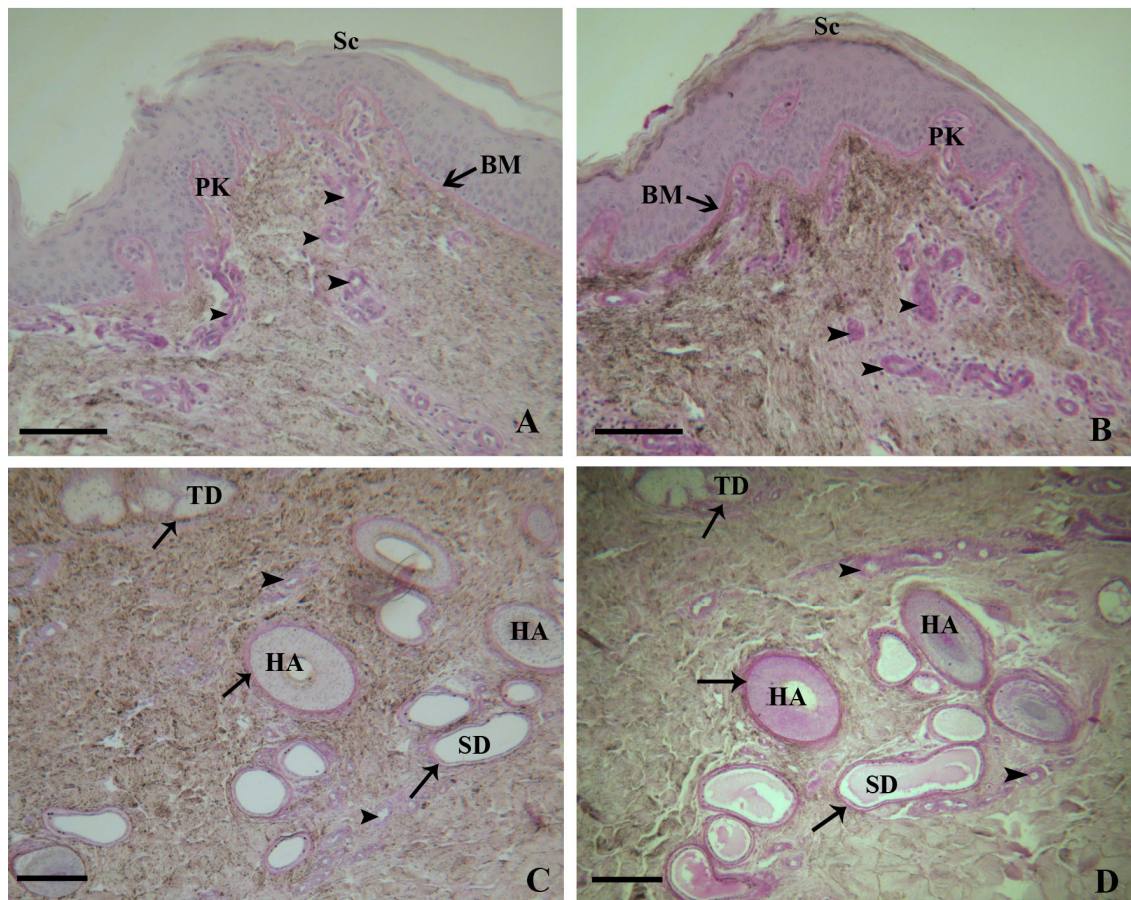
**A: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der seitlichen Zitzenbasis, PAS-Reaktion,** deutlich positive Reaktion des gesamten Haares (HA), am stärksten an der inneren Haarwurzelscheide (iHWS). Die Schweißdrüsen (SD) liegen sehr dicht am Haar (HA) und zeigen eine stark positive Reaktion an der Basalmembran (Pfeile), SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der seitlichen Zitzenbasis, Trichrom,** Haar im Querschnitt, die kollagenen Bindegewebsfasern des Stratum reticulare zeigen eine starke Anfärbung (faserreich, zellarm), das Zytoplasma der Zellen der inneren Haarwurzelscheide (iHWS) färbt sich stark positiv, das der äußeren Haarwurzelscheide (äHWS) schwach bis mittelstark, die Schweißdrüsen (SD) zeigen eine mittelstarke Anfärbung, DWS: dermale Haarwurzelscheide, SB: 100µm;

**C: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der seitlichen Zitzenbasis, HE, Übersicht** über ein Haar (HA) mit ihren benachbarten Talgdrüsen (TD), Ansammlung von Zellen mit basophilem Zellkern im Randbereich der Talgdrüsen (Pfeile), SB: 100µm;

**D: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der seitlichen Zitzenbasis, HE, Haar im Querschnitt,** Zytoplasma der inneren Haarwurzelscheide (iHWS) sehr schwach angefärbt, die kollagenen Bindegewebsfasern (Bdg) sind grob und locker verteilt, die Drüsenepithelzellen der Schweißdrüse (SD) sind deutlich abgeflacht, äHWS: äußere Haarwurzelscheide, SB: 100µm;



**Abb. 8: Euterhaut einer 9 Jahre alten Kuh**

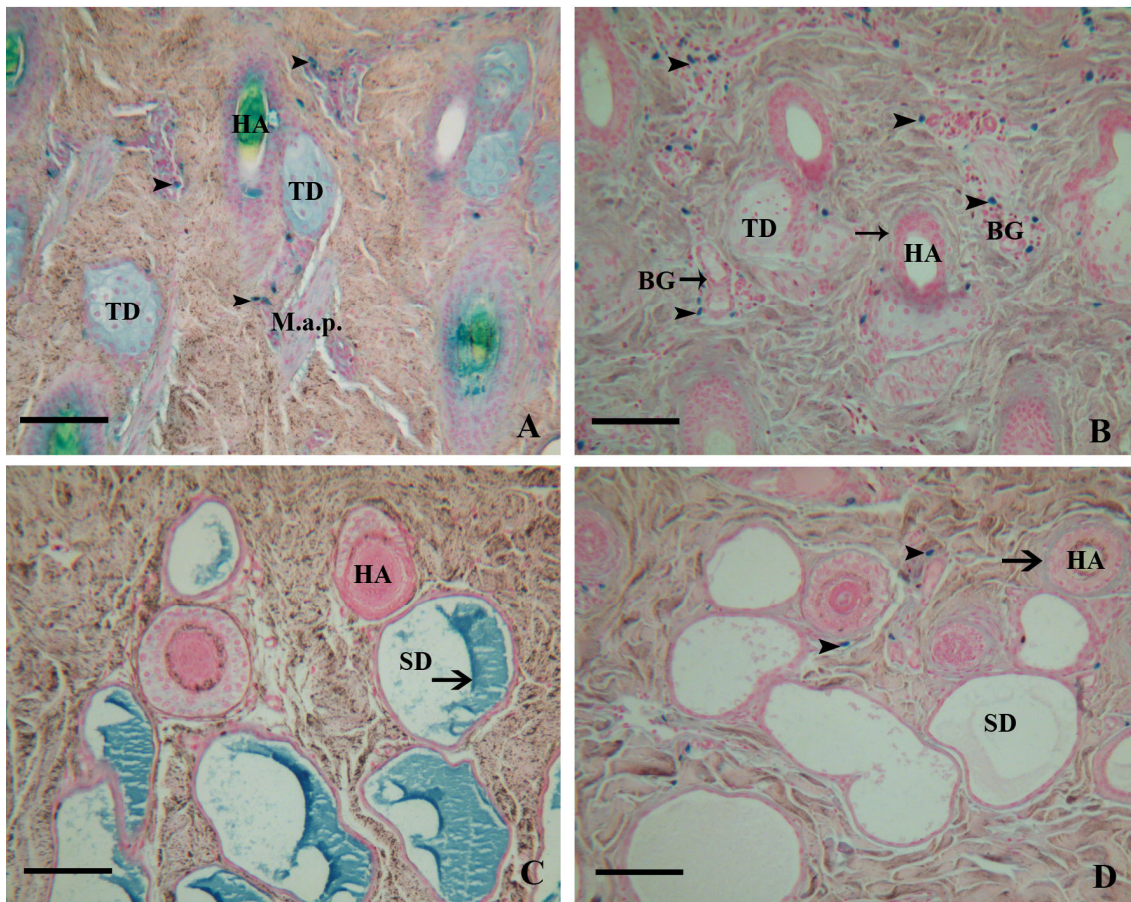
Vergleichende Darstellung der PAS-Reaktion mit Amylasevorbehandlung (Bild A und C) und ohne Amylasevorbehandlung (Bild B und D) von der Haut des seitlichen Euter-Vorderviertels desselben Tieres.

**A: Kuh, 9 Jahre alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels, PAS-Reaktion mit Amylasevorbehandlung, Str. corneum (Sc) teilweise abgeschilfert, Basalmembran der Epidermis (BM) mit schwach positiver Reaktion, Pfeilspitzen: subepidermale Blutgefäße mit schwacher bis mittlerer positiver Reaktion, Papillarkörper (PK) flach und wenig ausgeprägt, SB: 100µm;**

**B: Kuh, 9 Jahre alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels, PAS-Reaktion ohne Amylasevorbehandlung, Papillarkörper (PK) flach ausgebildet, Basalmembran der Epidermis (BM) mittlere positive Reaktion, Pfeilspitzen: subepidermale Kapillaren zeigen eine stark positive Reaktion, Sc: Stratum corneum, SB: 100µm;**

**C: Kuh, 9 Jahre alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels, PAS-Reaktion mit Amylasevorbehandlung, die Basalmembran (Pfeile) der Talg- und Schweißdrüsen (TD, SD), der Haare (HA) und der Blutgefäße (Pfeilspitzen) zeigt eine schwach positive Reaktion, Basalmembran der Talgdrüsen (TD) noch etwas schwächer als die übrigen Strukturen, SB: 200µm;**

**D: Kuh, 9 Jahre alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels, PAS-Reaktion ohne Amylasevorbehandlung, die Basalmembran (Pfeile) der Talg- und Schweißdrüsen (TD, SD), der Haare (HA) und der Blutgefäße (Pfeilspitzen) zeigt eine mittlere positive Reaktion, zusätzlich ist das Sekret der Schweißdrüsen (SD) schwach angefärbt, SB: 200µm;**

**Abb. 9: Euterhaut einer 19 Monate alten Färse**

Die Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 (Bild A und C) und 1,0 (Bild B und D). Bei beiden pH-Werten sind stark angefärbte freie Zellen in der Dermis aufgefallen.

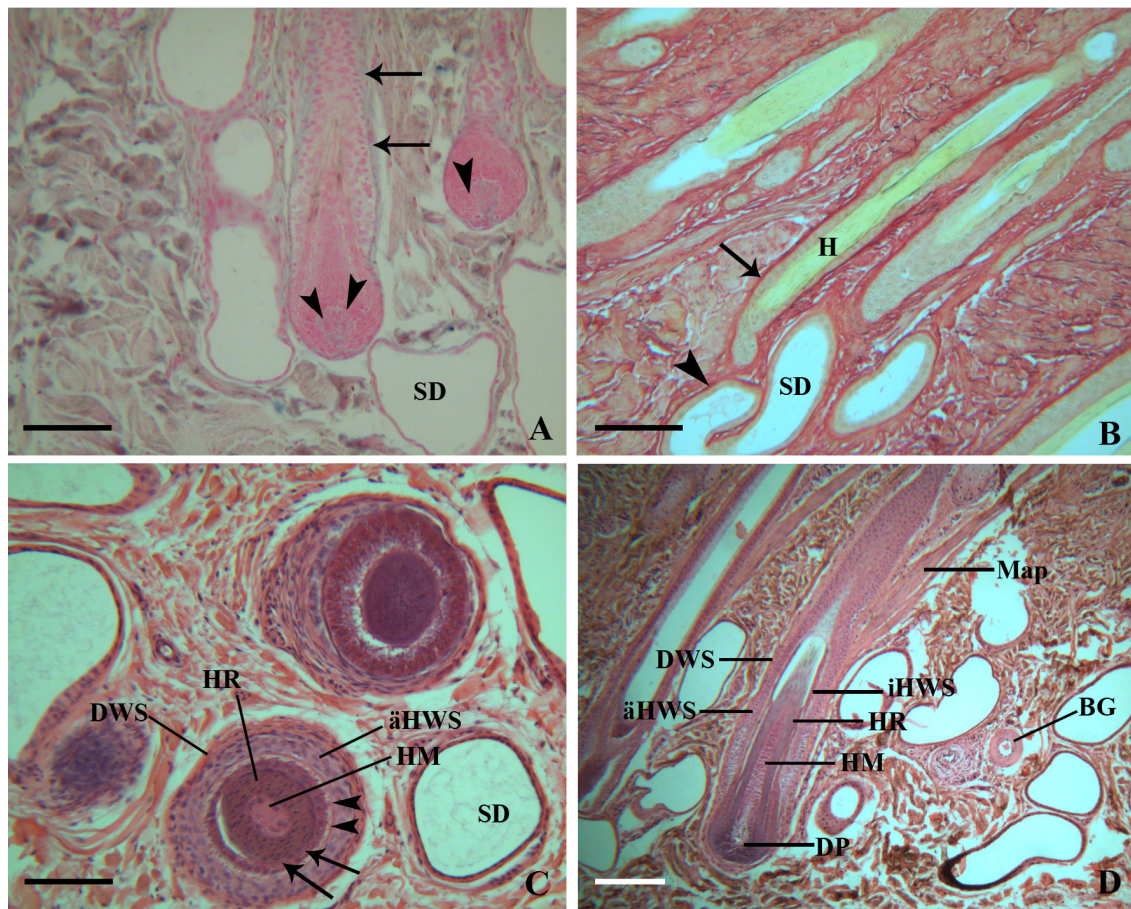
**A: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut des seitlichen Hinterviertels,** Alcianblau mit pH 2,5, Talgdrüsen (TD) mittelstark angefärbt, Haare (HA) und Musculus arrector pili (M.a.p.) schwach positiv, Pfeilspitzen: stark positiv angefärbte freie Zellen um Blutgefäße herum; SB: 100μm;

**B: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut des seitlichen Hinterviertels,** Alcianblau mit pH 1,0, Talgdrüse (TD) und dermale Haarwurzelscheide (Pfeil) der Haare (HA) sehr schwach positiv, Pfeilspitzen: stark positive freie Zellen vorwiegend um Blutgefäße (BG) herum, SB: 100μm;

**C: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels,** Alcianblau mit pH 2,5, Sekret (Pfeil) der Schweißdrüsen (SD) stark positiv gefärbt, HA: Haar, SB: 100μm;

**D: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut des seitlichen Vorderviertels,** Alcianblau mit pH 1,0, Sekret der Schweißdrüsen (SD) nicht angefärbt, dermale Haarwurzelscheide (Pfeil) der Haare (HA) schwach positiv, Pfeilspitzen: wenige freie Zellen, SB: 100μm;



**Abb. 10: Bovine Euterhaut: Darstellung der Haaranlagen**

Detailansicht der Haare von Färsen/Kühen. Bei der Alzianblau-Färbung pH 1,0 (Bild A) zeigen die dermale Haarwurzelscheide und die dermale Papille eine schwach positive Reaktion.

**A: Färse, 19 Monate alt, seitliche Euterhaut des Hinterviertels, Alzianblau mit pH-Wert 1,0, Haar im Längsschnitt, dermale Haarwurzelscheide (Pfeile) und dermale Papille (Pfeilspitzen) mit schwach positiver Reaktion, die Schweißdrüsen (SD) besitzen großlumige Endstücke, SB: 100µm;**

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels, Resorcin-Fuchsin-van-Gieson, Basalmembran (Pfeilspitze) der Schweißdrüsen (SD) und Basalmembran (Pfeil) der Haare (H) färbt sich stark rot an, SB: 100µm;**

**C: Kuh, 8 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels, HE, Haare im Querschnitt, Haarmark (HM) mit längsovalen Zellkernen und eosinophilem Zytoplasma, lässt sich gut von der Haarrinde (HR) abgrenzen, Haarrinde mit deutlicher Keratinisierung und Zellen mit stark eosinophilem Zytoplasma, die innere Haarwurzelscheide ist differenzierbar in die innere Huxley-Schicht (Pfeile) und die äußere Henle-Schicht (Pfeilspitzen), die äußere Haarwurzelscheide (äHWS) besteht aus mehreren Zellschichten von Zellen mit schwach eosinophilem Zytoplasma, die dermale Haarwurzelscheide (DWS) lässt sich gut abgrenzen, SD: Schweißdrüse, SB: 100µm;**

**D: Kuh, 4 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Hinterviertels, HE, Haare im Längsschnitt, dermale Papille (DP) gut abgrenzbar, Haarmark (HM) gut von Haarrinde (HR) zu unterscheiden, innere Haarwurzelscheide (iHWS) keratinisiert, keine Unterscheidung von Huxley- und Henle-Schicht möglich, äußere Haarwurzelscheide (äHWS) suprabulbar mit Aufhellung des Zytoplasmas, hochprismatische Zellform und dicker als im oberen Bereich, dermale Haarwurzelscheide (DWS) besteht aus zwei bis drei Zellschichten, Zellen des Blutgefäßes (BG) mit eosinophilem Zytoplasma, Erythrozytenaggregat im Lumen, Map: M. arrector pili, SB: 200µm;**



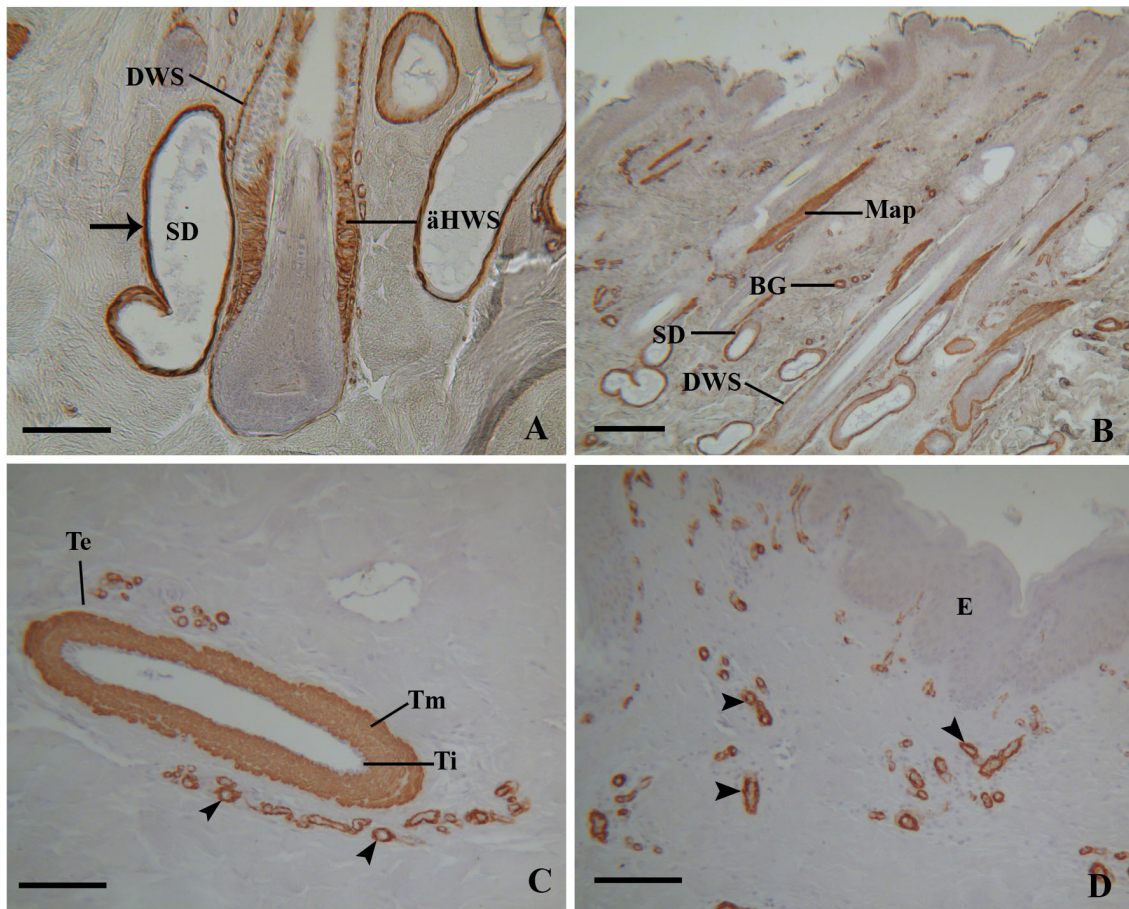
## **2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen**

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen wurden die in Kapitel 3 (Material und Methoden) genannten Kontrollen für jeden einzelnen Antikörper durchgeführt. Dabei zeigt die Positivkontrolle des Testgewebes die typische zu erwartende Bindung des Antikörpers. Die Negativkontrolle ist bei allen durchgeführten Untersuchungen negativ, sodass eine spezifische Bindung des Antikörpers sehr wahrscheinlich ist.

### **2.1. Expression von $\alpha$ -SMA in der bovinen Euterhaut**

In der Euterhaut von Kühen und Färsen kommt es zu einer deutlichen Expression von  $\alpha$ -SMA in den glatten Muskelzellen der Tunica media der Blutgefäße. Eine deutliche optische Abgrenzung vom umliegenden Gewebe ist auch beim Musculus arrector pili durch eine positive Expression zu beobachten (Abbildung 11: B). Im suprabulbären Bereich der äußeren Haarwurzelscheide lässt sich eine positive Expression von  $\alpha$ -SMA nachweisen. Zudem zeigt sich eine Expression in der dermale Haarwurzelscheide der Haare. Des Weiteren zeigt der Nachweis von  $\alpha$ -SMA eine positive Reaktion in den myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen.

Zwischen den verschiedenen Alters- und Laktationsstufen der beprobten Tiere zeigt sich ein einheitliches Bild bezüglich der Expression von  $\alpha$ -SMA in der bovinen Euterhaut. Im Bereich der Zitzenspitze und inneren Zitzenbasis stellen sich lediglich die Blutgefäße und einzelne Muskelfaserbündel im Stratum papillare positiv dar, da die übrigen Strukturen dort nicht vorhanden sind.

**Abb. 11: Expression von  $\alpha$ -SMA in der Euterhaut von Kühen und Färsen**

**A: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Darstellung einer Haaranlage und mehrerer Schweißdrüsen (SD), die äußere Haarwurzelscheide (ähWS) im suprabulbären Bereich mit positiver Reaktion, zudem positive Reaktion in der dermalen Haarwurzelscheide (DWS) und den myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen (Pfeile), SB: 100 $\mu$ m;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** positive Reaktion des Musculus arrector pili (Map), der myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen (SD), der dermalen Haarwurzelscheide (DWS) und der Blutgefäße (BG), SB: 200 $\mu$ m;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Darstellung einer Arterie der tiefen Dermis, die Tunica media (Tm) ist kräftig ausgebildet und zeigt eine positive Reaktion, die Tunica interna (Ti) und die Tunica externa (Te) sind negativ, glatte Muskelzellen kleiner umgebender Blutgefäße (Pfeilspitzen) stellen sich positiv dar, SB: 100 $\mu$ m;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** glatte Muskelzellen der Blutgefäße (Pfeilspitzen) positiv, E: Epidermis, SB: 100 $\mu$ m;

**Tabelle 5: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -SMA in der bovinen Euterhaut**

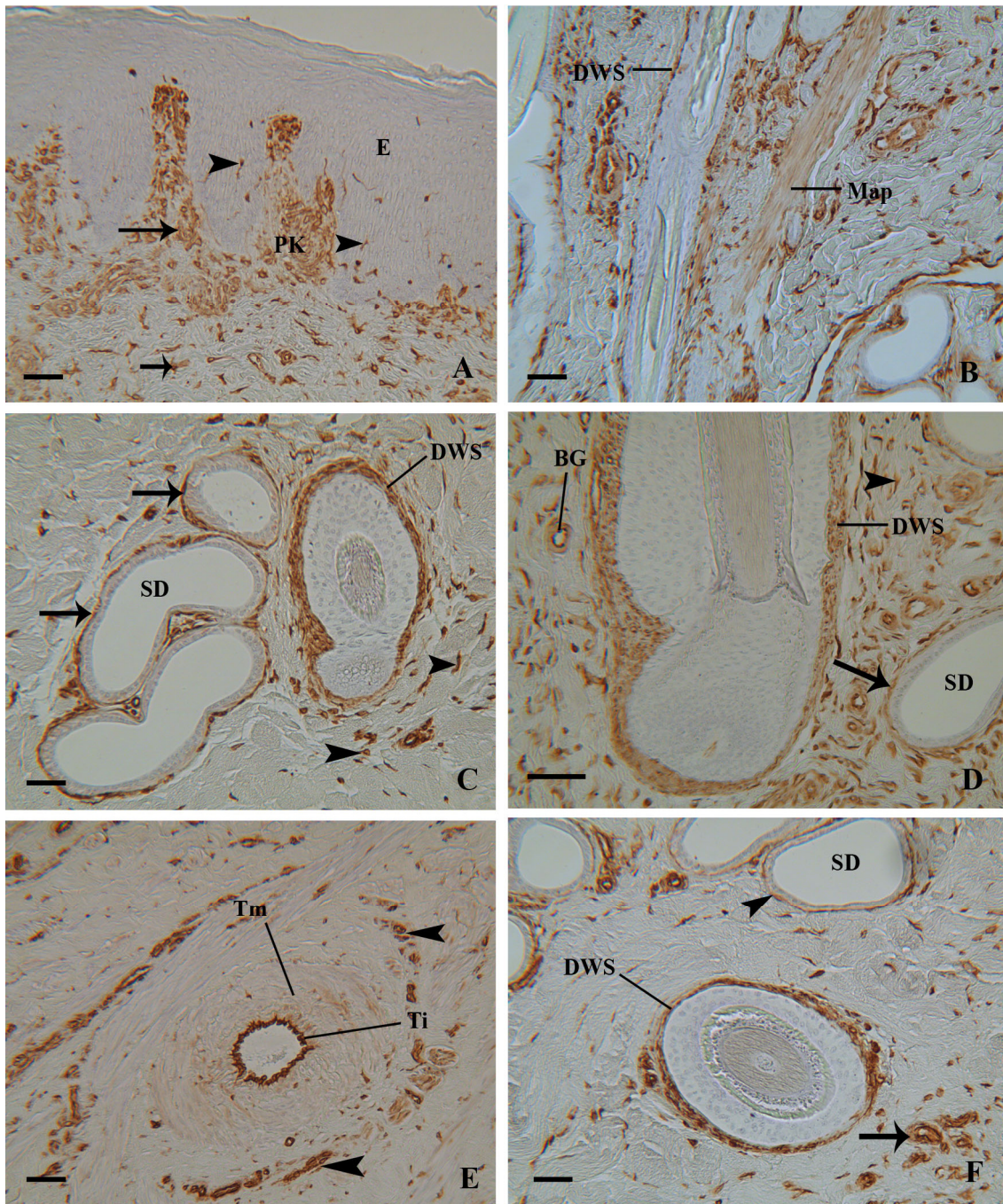
Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzen spitze</b>	Blutgefäße	3	Tunica media der Blutgefäße und Kapillaren
	Muskelfasern	1	
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Blutgefäße	3	Kleine Kapillaren stärker pos.; Tunica media
	Dermale HWS	1	
	Schweißdrüse	2	
	Muskelfasern	1	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Blutgefäße	2	Tunica media der Blutgefäße und Kapillaren
	Muskelfasern	1	
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Blutgefäße	3	Tunica media und v.a. subepidermale Kapillaren
	M. a. pili	2	
	Äußere HWS	1	suprabortal; im Querschnitt innen
	Dermale HWS	2	nur im unteren Bereich, bei einer Färsen nur bei einzelnen Haaren pos.
	Schweißdrüse	2	
	Muskelfasern	1	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Blutgefäße	2	Tunica media, kleine Kapillaren (liegen vorwiegend subepidermal)
	M. a. pili	1	
	Äußere HWS	1	im Querschnitt innen
	Dermale HWS	1	
	Schweißdrüse	2	
	Muskelfasern	1	Tunica media der Blutgefäße und Kapillaren

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, M. a. pili: Musculus arrector pili, pos.: positiv, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

## 2.2. Expression von Vimentin in der bovinen Euterhaut

Die Expression von Vimentin in der Euterhaut von Kühen und Färsen kann durch die immunhistologische Untersuchung in dem Endothel und der Tunica media der Blutgefäße, der dermalen Haarwurzelscheide und den Fibrozyten der Dermis nachgewiesen werden. Eine schwache Reaktion kann zusätzlich in den Muskelzellen des Haarbalgmuskels festgestellt werden. In einigen Bereichen der Epidermis, vorwiegend im Stratum spinosum, und teilweise auch im subepidermalen Bindegewebe, können durch diese Untersuchung dendritische Zellen dargestellt werden (Abbildung 12: A). Die myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen zeigen sich ebenfalls positiv (Abbildung 12: C).



**Abb. 12: Expression von Vimentin in der Euterhaut von Kühen und Färsen**

**A: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** im Stratum spinosum der Epidermis (E) vereinzelt positive Zellen mit Ausläufern (Pfeilspitzen), im Papillarkörper (PK) und subepidermal viele Fibrozyten und Kapillaren (Pfeile) mit positiver Expression, SB: 50µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Musculus arrector pili (Map) schwach positiv, Fibrozyten der dermalen Haarwurzelscheide (DWS) mit Expression, in der gesamten Dermis einzelne Fibrozyten positiv, SB: 50µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** dermale Haarwurzelscheide (DWS) mit deutlicher Expression, ebenso die Fibrozyten (Pfeile) der Schweißdrüsen (SD), einzelne Fibrozyten (Pfeilspitzen) in der Dermis positiv, SB: 50µm;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** ein Haar im Längsschnitt mit Schweißdrüse (SD), Blutgefäße (BG) mit schwacher Reaktion der Tunica media und starker Reaktion des Gefäßendothels, dermale Haarwurzelscheide (DWS) deutlich positiv, Myoepithelzellen (Pfeil) der Schweißdrüsen (SD) und Fibrozyten der Dermis (Pfeilspitzen) mittelstark positiv, SB: 25µm;

**E: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Arterie der tiefen Dermis, Tunica interna (Ti) mit starker Reaktion, Tunica media (Tm) mit schwacher Reaktion, umgebende Fibrozyten (Pfeilspitzen), SB: 50µm;

**F: Kuh, 9 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** ein Haar im Querschnitt, dermale Haarwurzelscheide (DWS) mit Expression, Blutgefäße (Pfeil) in der Dermis, myoepitheliale Zellen (Pfeilspitze) der Schweißdrüse (SD) positiv, 50µm;

**Tabelle 6: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzen spitze</b>	Papillarkörper	2	Fibrozyten, dendritische Zellen und Kapillaren
	Epidermis	2	einzelne dendritische Zellen
	Blutgefäße	3	Endothelzellen der Tunica interna pos.
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Blutgefäße	2	Endothelzellen der Tunica interna pos., Tunica media: 1
	Epidermis	2	einzelne dendritische Zellen
	Dermale HWS	2	Fibrozyten
	M.a.p.	1	
	Schweißdrüse	2	Fibrozyten der Schweißdrüse
<b>Zitzenbasis medial</b>	Blutgefäße	2	Endothelzellen der Tunica interna pos.
	Epidermis	2	wenige einzelne dendritische Zellen
	Papillarkörper	2	Fibrozyten, dendritische Zellen und Kapillaren
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Blutgefäße	3	Endothelzellen der Tunica interna pos., Tunica media: 1
	Epidermis	2	wenige einzelne dendritische Zellen
	Talgdrüse	2	Fibrozyten der Talgdrüse
	M.a.p.	1	
	Dermale HWS	2	
	Schweißdrüse	2	Fibrozyten der Schweißdrüse
	Papillarkörper	2	Fibrozyten, dendritische Zellen und Kapillaren
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Blutgefäße	2	Endothelzellen, Tunica interna pos., Tunica media: 1
	Epidermis	2	einzelne dendritische Zellen
	Papillarkörper	2	Fibrozyten, dendritische Zellen und Kapillaren
	Dermale HWS	2	
	M.a.p.	1	
	Schweißdrüse	2	Myoepitheliale Zellen
	Talgdrüse	2	Fibrozyten der Talgdrüse

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, M.a.p.: Musculus arrector pili, pos.: positiv, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

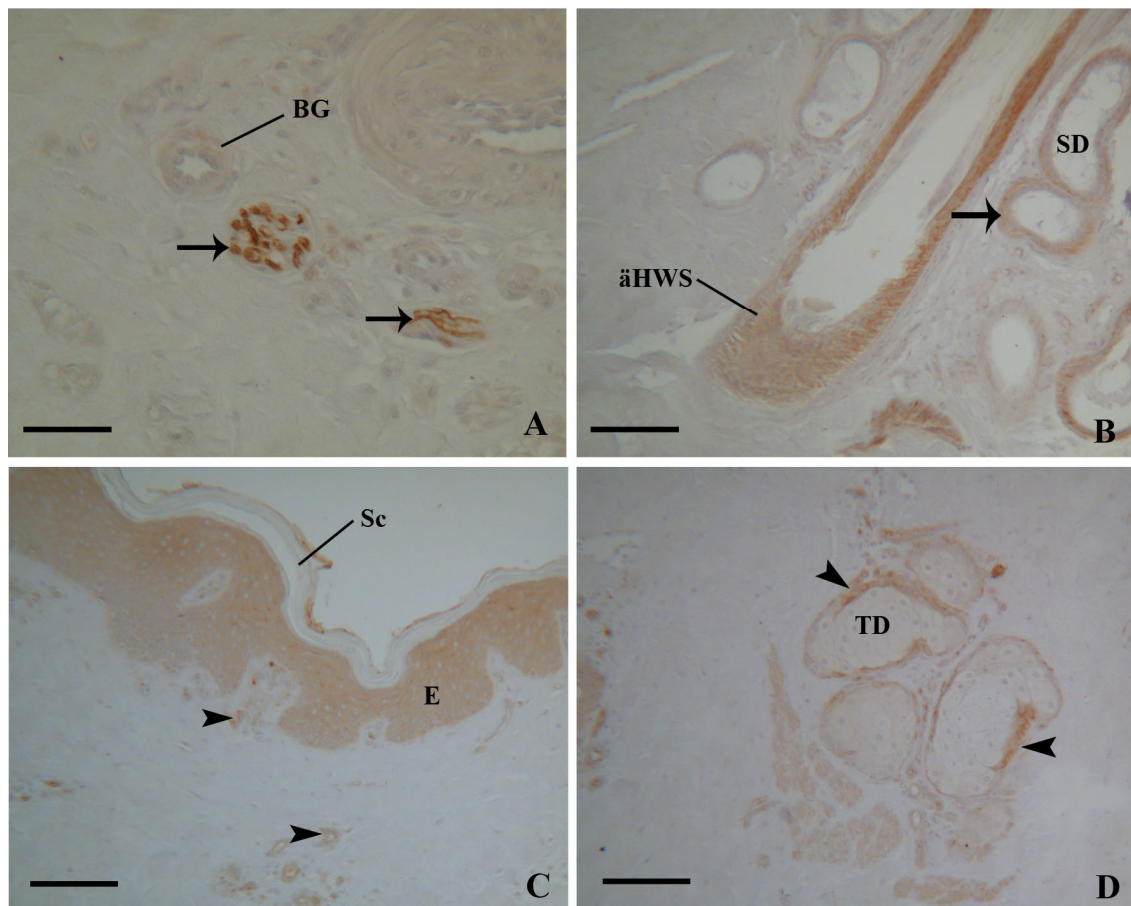
### 2.3. Expression von GFAP in der bovinen Euterhaut

Im Rahmen der Untersuchung kann generell nur eine schwache Expression von GFAP in der bovinen Euterhaut festgestellt werden. In der tiefen Dermis sind vereinzelt mittelstark positive Nervenfasern dargestellt (Abbildung 13: A).



Folgende Strukturen lassen eine schwache Expression erkennen: äußere Haarwurzelscheide der Haaranlage, Epidermis, subepitheliale Kapillaren (Tunica media), basale Bereiche der Schweißdrüsenepithelzellen und die Basalmembran der Talgdrüsen.

**Abb. 13: Expression von GFAP in der Euterhaut von Kühen und Färsen**



**A: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Ansicht der tiefen Dermis, Nerv im Querschnitt mit deutlich positiver Expression in den Nervenfaserbündeln (Pfeil), daneben ein Blutgefäß (BG) mit negativer Reaktion, SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Darstellung eines Haares und Schweißdrüsen der Dermissschicht, die äußere Haarwurzelscheide (äHWS) mit schwacher Expression, ebenso wie im basalen Bereich (Pfeil) der Schweißdrüsenzellen (SD), SB: 100µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Ansicht der Epidermis und des oberen Stratum reticulare, Epidermis (E) schwach positiv, etwas stärker im Stratum granulosum, Stratum corneum (Sc) negativ, bis auf einige Stellen im oberen Bereich, einige Kapillaren und Nervenfasern (Pfeile) im Papillarkörper und superepithelial mit schwacher Expression, SB: 100µm;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Darstellung einer Talgdrüsenanlage (TD) mit 4 Drüsenalveolen, Basalmembran (Pfeilspitzen) der Talgdrüsen schwach positiv, SB: 100µm;

**Tabelle 7: Immunhistochemischer Nachweis von GFAP in der bovinen Euterhaut**

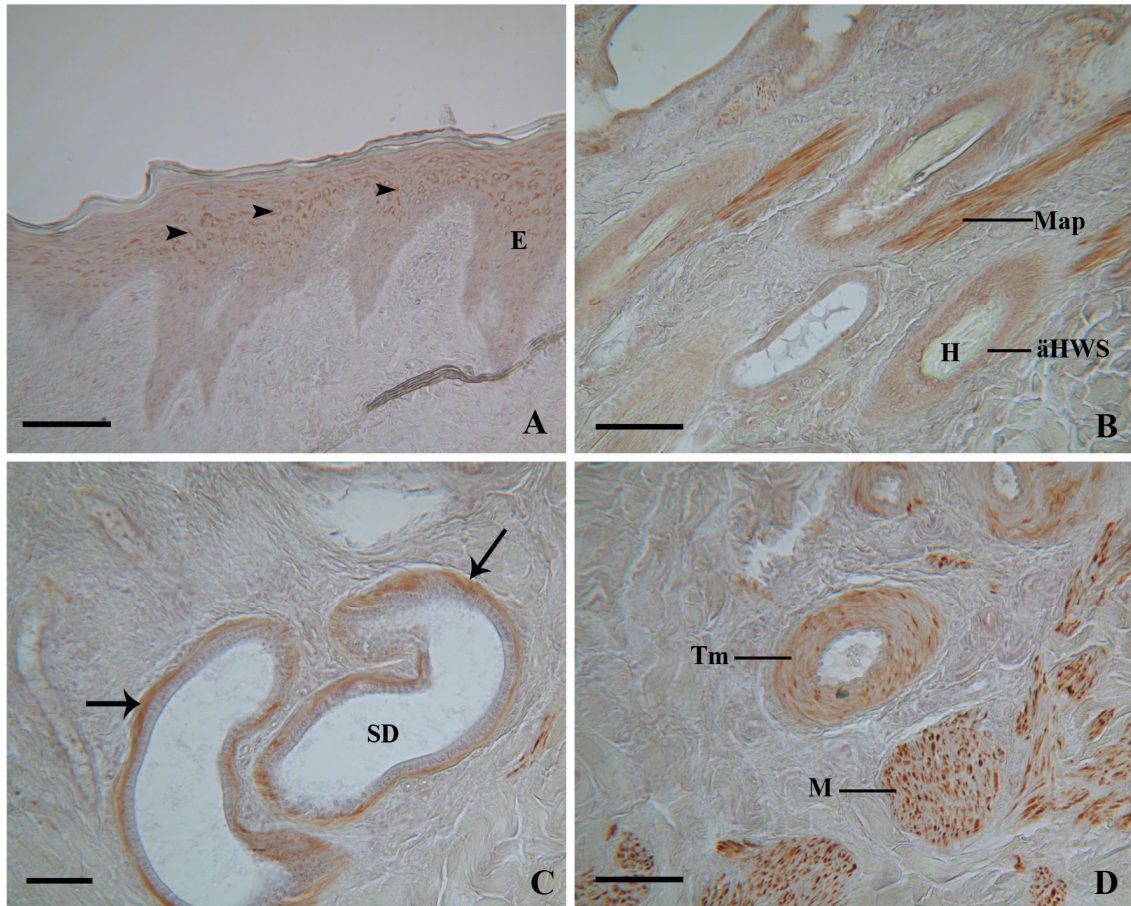
Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Nervenfasern	2	im Str. reticulare
	Epidermis	1	Stratum corneum an einigen Stellen
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Blutgefäße	1	Tunica media
	Epidermis	1	
	Äußere HWS	1	
	Schweißdrüse	1	Basale Bereiche der Schweißdrüse
<b>Zitzenbasis medial</b>	Blutgefäße	1	Tunica media
	Epidermis	1	Str. spinosum und Str. granulosum
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Blutgefäße	1	Tunica media
	Epidermis	1	Str. corneum teilweise stärker (1-2)
	Talgdrüse	1	Basalmembran der Talgdrüse
	Äußere HWS	1	
	Schweißdrüse	1	Basalmembran der Schweißdrüse
	Papillarkörper	2	Nervenzellen
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Blutgefäße	1	v.a. subepitheliale Kapillaren
	Epidermis	1	
	Äußere HWS	1	
	Schweißdrüse	1	Basale Bereiche der Schweißdrüse
	Talgdrüse	1	Basalmembran der Talgdrüse

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, pos.: positiv, Str.: Stratum, v.a.: vor allem, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

#### 2.4. Expression von Desmin in der bovinen Euterhaut

Desmin wird mittelstark in den Muskelfaserbündeln der Dermis der Euterhaut exprimiert, wodurch sich der Musculus arrector pili optisch deutlich vom Bindegewebe der Dermis absetzt. Eine durchgehend schwache Expression kann in der Epidermis festgestellt werden. Bei einigen Tieren zeigen sich, vom übrigen Gewebe dunkel abgesetzt, intrazelluläre Strukturen im Stratum spinosum der Epidermis (Abbildung 14: A). Weitere schwach positive Gewebeanteile der Euterhaut sind die myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen, die Tunica media der Blutgefäße und die äußere Haarwurzelscheide.



**Abb. 14: Expression von Desmin in der Euterhaut von Kühen und Färsen**

**A: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Epidermis (E) mit schwacher Expression, im oberen Stratum spinosum fallen stärker angefärbte intrazelluläre Strukturen (Pfeilspitzen) auf, SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Haarbalgmuskel (Map) mittelstark positiv, schwache Expression in der äußeren Haarwurzelscheide (äHWS) und der Schweißdrüse, H: Haar, SB: 100µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** deutliche Expression in den myoepithelialen Zellen (Pfeile) der Schweißdrüsen (SD), SB: 25µm;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** Tunica media (Tm) eines Blutgefäßes mit positiver Reaktion, Muskelfasern (M) in der Dermis, SB: 100µm

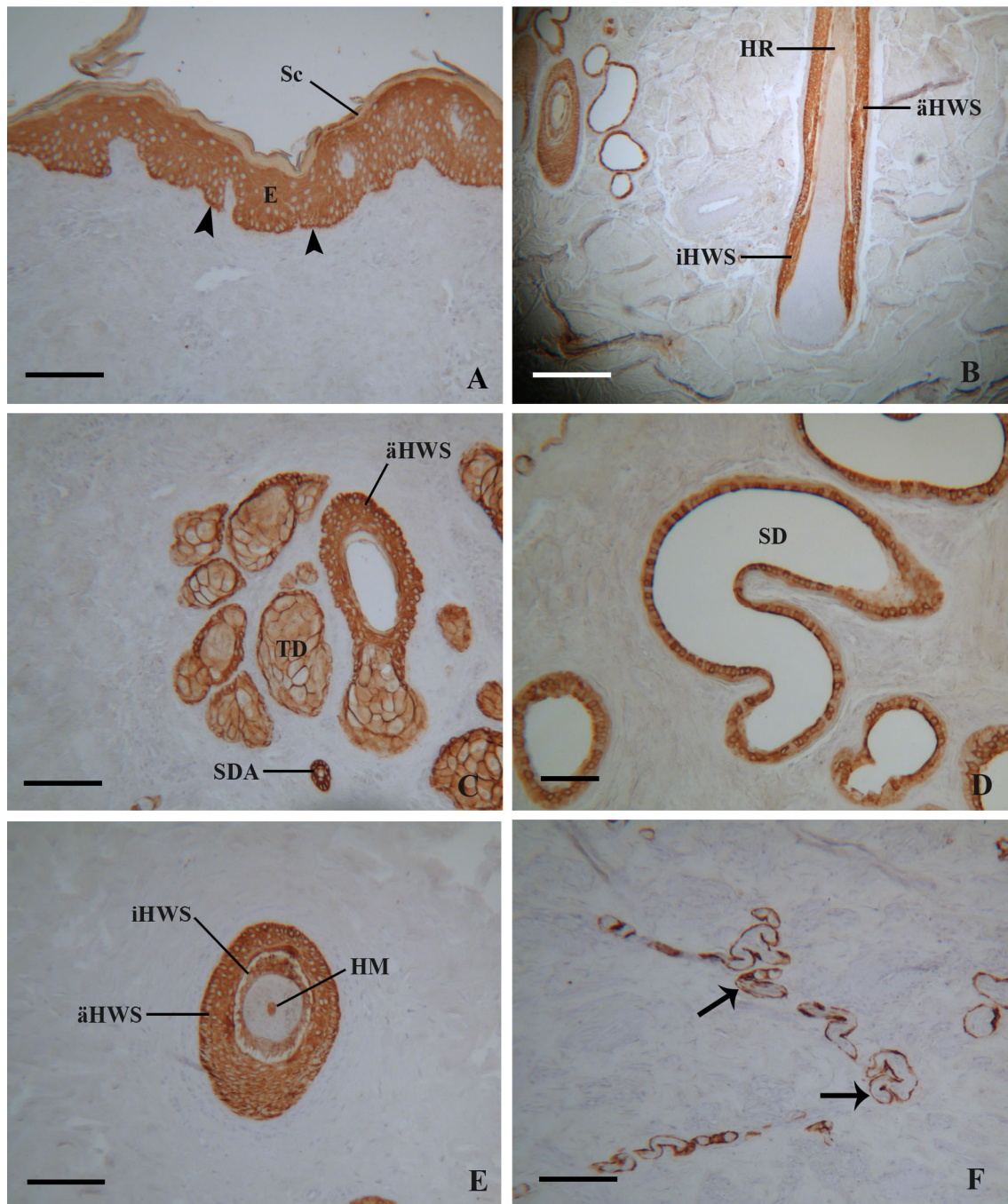
**Tabelle 8: Immunhistochemischer Nachweis von Desmin in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Muskelfasern	2	
	Blutgefäße	2	Tunica media
	Epidermis	1	v.a. im Str. spinosum
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Blutgefäße	2	Tunica media
	Epidermis	1	
	Muskelfasern	2	
	Schweißdrüse	2	Myoepitheliale Zellen
<b>Zitzenbasis medial</b>	Blutgefäße	1	Tunica media
	Muskelfasern	2	
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Blutgefäße	2	Tunica media
	Epidermis	1	
	M. a. pili	2	
	Äußere HWS	1	
	Schweißdrüse	1	Myoepitheliale Zellen
	Muskelfasern	2	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Blutgefäße	2	Tunica media
	Epidermis	1	
	M. a. pili	2	
	Äußere HWS	1	
	Muskelfasern	2	

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, pos.: positiv, Str.: Stratum, M. a. pili: Musculus arrector pili, v.a.: vor allem, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

## 2.5. Expression von Pancytokeratin in der bovinen Euterhaut

Durch die immunhistologische Untersuchung der Euterhaut mit dem Antikörper gegen Pancytokeratin kann eine Expression in epithelialen Gewebeanteilen festgestellt werden. Dies sind unter anderem die Epidermis, wobei das Stratum corneum nur eine schwach positive Reaktion zeigt, Anteile von Blut- und Lymphgefäßen (Abbildung 15: F), die Talgdrüsen, einzelne Anteile der Haaranlage und die Schweißdrüsenepithelzellen. Bei den Haaranlagen stellt sich die äußere Haarwurzelscheide stets positiv dar. Die innere Haarwurzelscheide ist nur bei manchen Schnitten bzw. bei manchen Haaranlagen innerhalb eines Schnittes positiv. Bei einigen Proben wird Pancytokeratin auch im Haarmark und/oder der Haarrinde exprimiert (Abbildung 15: B und E).

**Abb. 15: Expression von Pancytokeratin in der Euterhaut von Kühen und Färsen**



**A: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Stratum corneum (Sc) mit schwacher Expression, restliche Epidermis (E) deutlich positiv, vor allem im basalen Bereich des Str. basale (Pfeilspitzen), SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** ein Haar im Längsschnitt, äußere und innere Haarwurzelscheide (äHWS, iHWS) positiv, Haarrinde (HR) mit schwacher Expression, SB: 100µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** ein Haar mit umgebenden Talgdrüsen (TD), äußere Haarwurzelscheide (äHWS) deutlich abgesetzt, ein Schweißdrüsenausführungsgang (SDA) mit kleinem Lumen sichtbar, SB: 100µm;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** positive Reaktion in den Epithelzellen der Schweißdrüsen (SD), SB: 25µm;

**E: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Hinterviertels,** ein Haar im Querschnitt, Expression im Haarmark (HM), in der inneren Haarwurzelscheide (iHWS) und der äußeren Haarwurzelscheide (äHWS), SB: 100µm;

**F: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** positive Endothelzellen (Pfeile) von Lymphgefäßen in der tiefen Dermis, SB: 100µm;

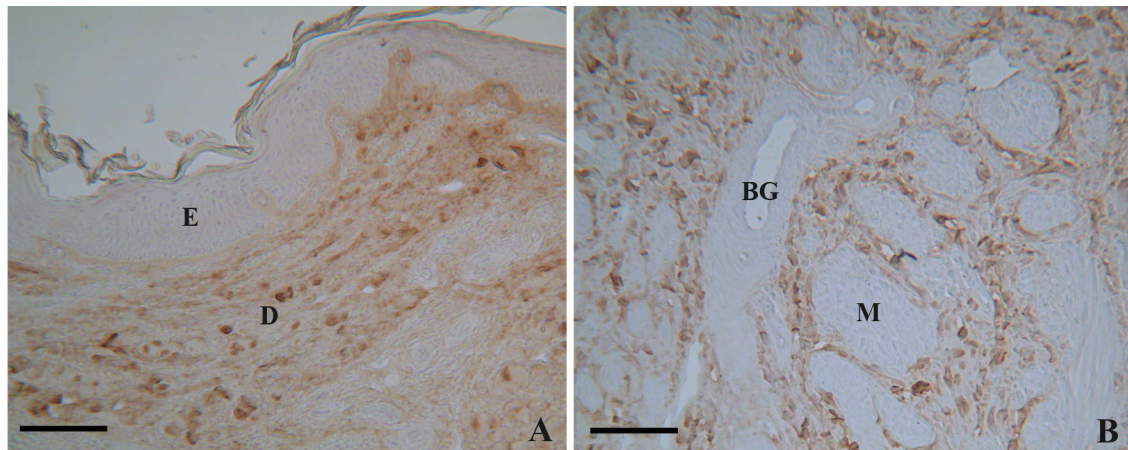
**Tabelle 9: Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Blut-/Lymphgefäße	3	Endothelzellen
	Epidermis	2	Str. corneum nur schwache Reaktionsintensität
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Blut-/Lymphgefäße	3	Endothelzellen
	Epidermis	2	Str. corneum nur schwache Reaktionsintensität
	Innere HWS	2	
	Äußere HWS	2	
	Schweißdrüse	2	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Blut-/Lymphgefäße	3	Endothelzellen
	Epidermis	2	Str. corneum nur schwache Reaktionsintensität
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Blut-/Lymphgefäße	3	Endothelzellen
	Epidermis	2	Str. corneum nur schwache Reaktionsintensität
	Innere HWS	1	
	Talgdrüse	1	v.a. an Zellmembranen
	Äußere HWS	2	
	Schweißdrüse	2	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Blut-/Lymphgefäße	3	Endothelzellen
	Epidermis	2	Str. corneum nur schwache Reaktionsintensität
	Innere HWS	2	nicht bei allen Haaren, einige auch neg.
	Äußere HWS	2	
	Schweißdrüse	2	
	Talgdrüse	1	Zellmembranen mit mittlerer Expression

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, neg.: negativ, v.a.: vor allem, Str.: Stratum, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

## 2.6. Expression von Kollagen-1 in der bovinen Euterhaut

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Färbung ergibt eine schwache Expression von Kollagen-1 in den kollagenen Bindegewebsfasern der bovinen Dermis (Abbildung 16). Diese sind diffus in der gesamten Dermis vorhanden. Zusätzlich zeigt die Basalmembran der Epidermis eine schwache Reaktion.

**Abb. 16: Expression von Kollagen-1 in der Euterhaut von Kühen**

**A: Kuh, 9 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels**, gute Abgrenzung von Epidermis (E) und Dermis (D) möglich, schwach positiv gefärbte Basalmembran und kollagene Bindegewebsfasern diffus in der gesamten Dermis verteilt, SB: 100µm;

**B: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze**, Ansicht der tiefen Dermis, positive kollagene Bindegewebsfasern setzen sich deutlich gegenüber den ungefärbten Muskelfasern (M) und Blutgefäßen (BG) ab, SB: 100µm;

**Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-1 in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Kollagene Bindegewebsfasern	1	diffus in der Dermis
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Kollagene Bindegewebsfasern	1	diffus in der Dermis
<b>Zitzenbasis medial</b>	Kollagene Bindegewebsfasern	1	diffus in der Dermis
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Kollagene Bindegewebsfasern	1	diffus in der Dermis
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Kollagene Bindegewebsfasern	1	diffus in der Dermis

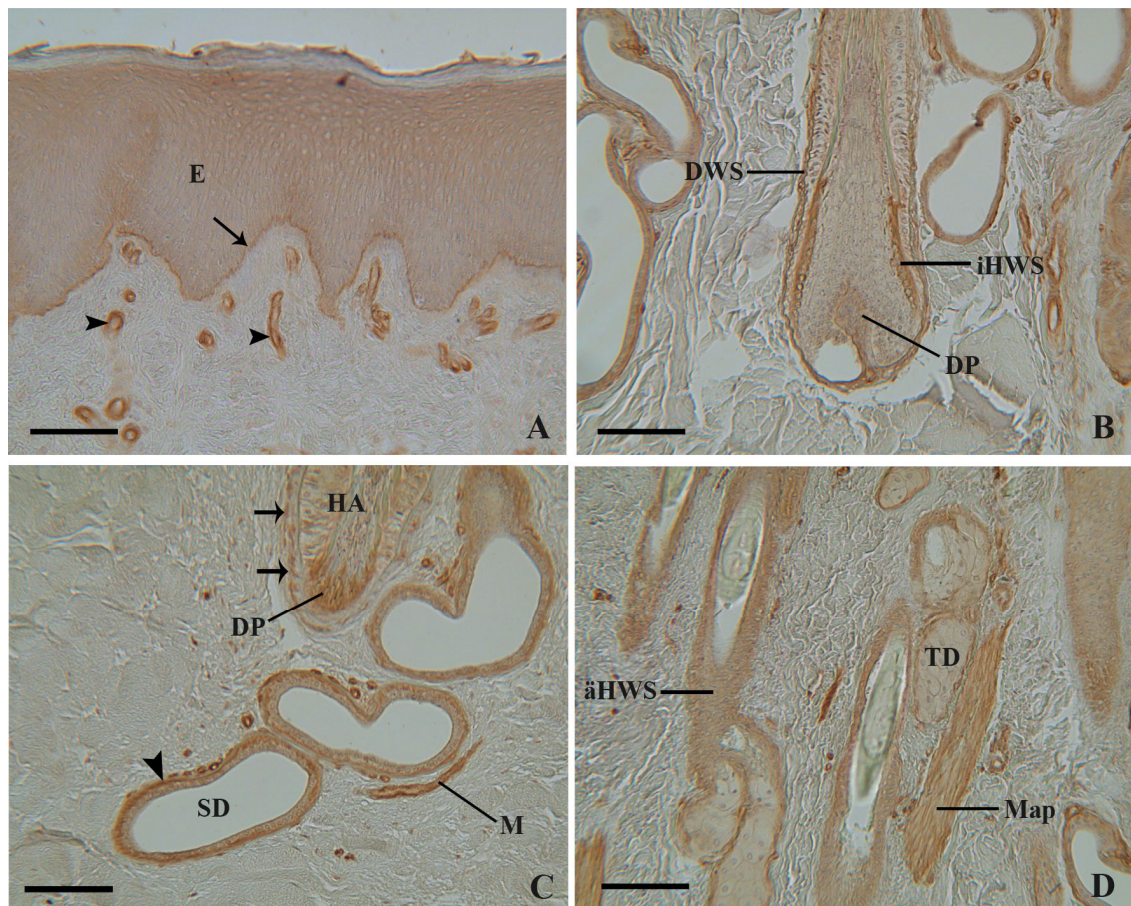
re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

## 2.7. Expression von Laminin in der bovinen Euterhaut

Die immunhistochemische Färbung der bovinen Euterhaut zur Überprüfung des Vorkommens von Laminin ergibt eine Expression mit mittlerer Intensität in den Basalmembranen verschiedener Hautstrukturen. Dies sind: Basalmembran der Epidermis, der dermalen Papille, des Haares, der Schweißdrüsen und der Talgdrüsen.

Zudem ergibt sich eine positive Reaktion am Gefäßendothel und der Basalmembran der Blutgefäße (Abbildung 17: A). Des Weiteren zeigen die Muskelzellen des Haarbalgmuskels eine Expression. Eine schwache Anfärbung kann in der äußeren Haarwurzelscheide und den Zellen der Epidermis festgestellt werden.

**Abb. 17: Expression von Laminin in der Euterhaut von Kühen und Färsen**



**A: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Epidermis (E) positiv, Basalmembran (Pfeil) der Epidermis mit mittelstarker Reaktion, Endothel und Basalmembran der Blutgefäße (Pfeilspitzen) positiv, SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Haar im Längsschnitt, dermale Papille (DP), vor allem Basalmembran positiv, innere Haarwurzelscheide (iHWS) im unteren Bereich und dermale Haarwurzelscheide (DWS) inklusive Basalmembran desHaares mit mittlerer Reaktion, SB: 100µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Schweißdrüsen (SD) und Basalmembran (Pfeilspitze) positiv, Muskelzellen (M) (Haarbalgmuskel) mittlere Expression, Strukturen des Haares (HA), dermale Papille (DP) und Basalmembran (Pfeile), SB: 100µm;

**D: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** Talgdrüse (TD) schwach, ihre Basalmembran deutlich angefärbt, Musculus arrector pili (Map) mit mittelstarker Expression, äußere Haarwurzelscheide (äHWS) schwach positiv, SB: 100µm;

**Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von Laminin in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzen spitze</b>	Epidermis	1	
	BM der Epidermis	2	
	Blutgefäße	2	Endothel und Basalmembran
	Muskelfasern	1	
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	1	
	BM der Epidermis	2	
	Blutgefäße	2	Endothel und Basalmembran
	Äußere HWS	1	
	Dermale HWS	1	Basalmembran
	Dermale Papille	1	
	Talgdrüse	1	v.a. Basalmembran
	Schweißdrüse	1	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	
	BM der Epidermis	2	
	Blutgefäße	1	Endothel und Basalmembran
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	v.a. Basalmembran
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	2	Endothel und Basalmembran
	M. a. pili	2	
	Äußere HWS	1	
	Dermale Papille	1	
	Talgdrüse	1	v.a. Basalmembran
	Schweißdrüse	1	Basalmembran mehr pos.
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	
	Blutgefäße	2	vorwiegend Endothel und Basalmembran
	M. a. pili	2	
	Äußere HWS	1	
	Dermale HWS	1	Basalmembran
	Dermale Papille	1	
	Talgdrüse	1	v.a. Basalmembran
	Schweißdrüse	1	v.a. Basalmembran

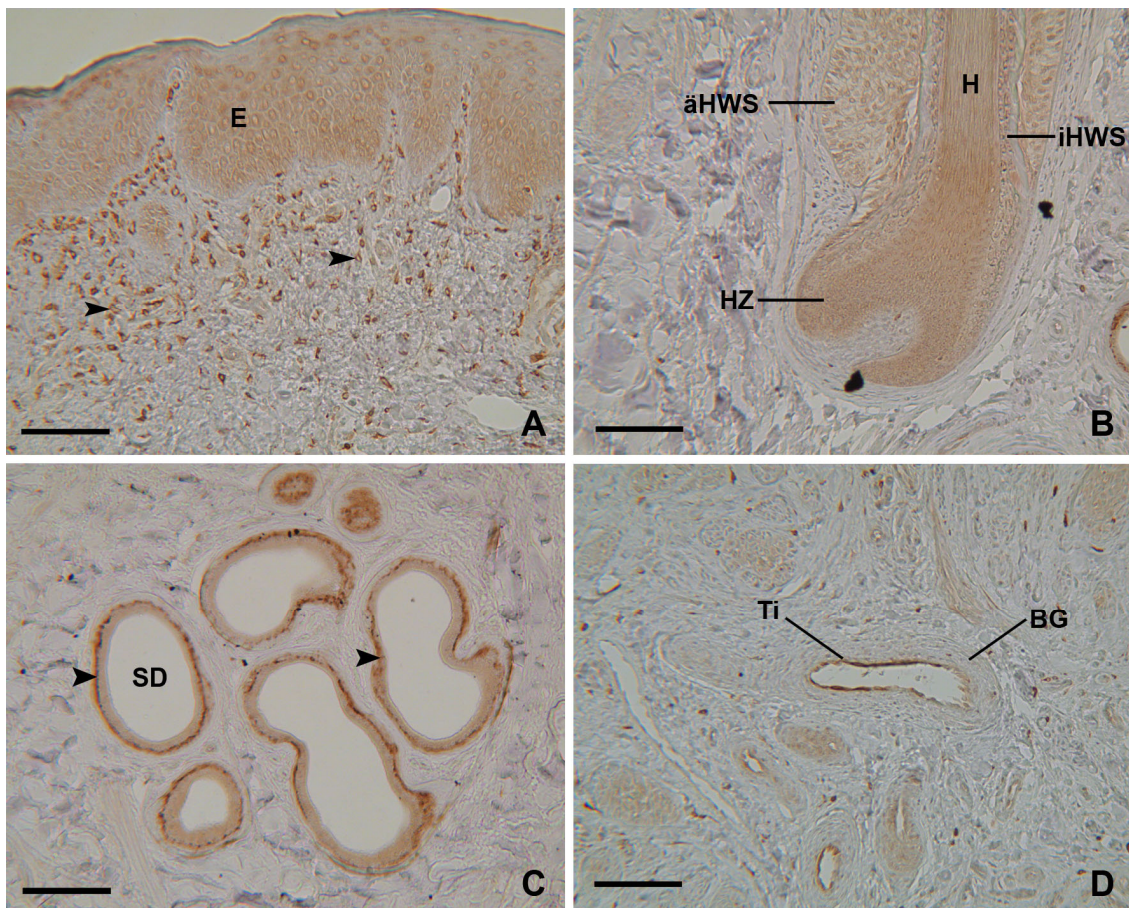
HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinter-  
 viertel des Kuheuters, pos.: positiv, v. a.: vor allem, M. a. pili: Musculus arrector pili, BM:  
 Basalmembran, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlere  
 Intensität, 3: Expression starker Intensität



## 2.8. Expression von COX-1 in der bovinen Euterhaut

Bei der Untersuchung der Euterhaut mit dem Antikörper gegen COX-1 kann eine deutliche Expression in den Fibrozyten des Stratum papillare und Stratum reticulare der Dermis festgestellt werden. Zudem sind schwach positive Reaktionen in der Epidermis, den Talgdrüsen, den Schweißdrüsen (in den basalen Anteilen der Epithelzellen noch ausgeprägter) und mehreren Teilen der Haare (äußere Haarwurzelscheide, Haarzwiebel, Teile der inneren Haarwurzelscheide, Haarmark) sichtbar. Deutlich positiv stellen sich auch die Endothelzellen der Blutgefäße dar.

**Abb. 18: Expression von COX-1 in der Euterhaut von Kühen und Färsen**



**A: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** Darstellung von Epidermis und Dermis, Epidermis (E) mit schwacher Expression (ausgenommen Stratum corneum), in der subepithelialen Dermis viele mittelstark angefärbte Zellen (Fibrozyten) (Pfeilspitzen), SB: 100µm;

**B: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** unterer Teil eines Haares im Längsschnitt, eine schwach positive Reaktion kann in der äußeren Haarwurzelscheide (äHWS), der Huxley-Schicht der inneren Haarwurzelscheide (iHWS), der Haarzwiebel (HZ) und dem Haar (H) festgestellt werden, SB: 100µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** mehrere Schweißdrüsen (SD) im Querschnitt, mittelstark positiv stellen sich basale Zellanteile der Schweißdrüsenepithelzellen (Pfeilspitzen) dar, SB: 100µm;

**D: Kuh 9 Jahre alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** Blutgefäß (BG) im Querschnitt, die Tunica interna (Ti) zeigt eine mittelstarke Expression von COX-1, SB: 100µm;

**Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von COX-1 in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	1	einzelne Zellen im Str. basale und Str. spinosum
	Blutgefäße	2	Gefäßendothelzellen
	Str. papillare	3	Fibrozyten
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	1	
	Papillarkörper	3	Fibrozyten
	Blutgefäße	3	Gefäßendothelzellen
	Dermale Papille	1	
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	1	BM: 2
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	
	Blutgefäße	3	Gefäßendothelzellen
	Str. papillare	3	Fibrozyten
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	einzelne Zellen im Str. basale und Str. spinosum
	Str. papillare	2	Fibrozyten
	Blutgefäße	2	Gefäßendothelzellen
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	1	BM: 2
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	
	Str. papillare	2	Fibrozyten
	Blutgefäße	2	Gefäßendothelzellen
	Äußere HWS	1	
	Haarzwiebel	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	1	BM: 2

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, BM: Basalmembran, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

### **2.9. Expression von COX-2 in der bovinen Euterhaut**

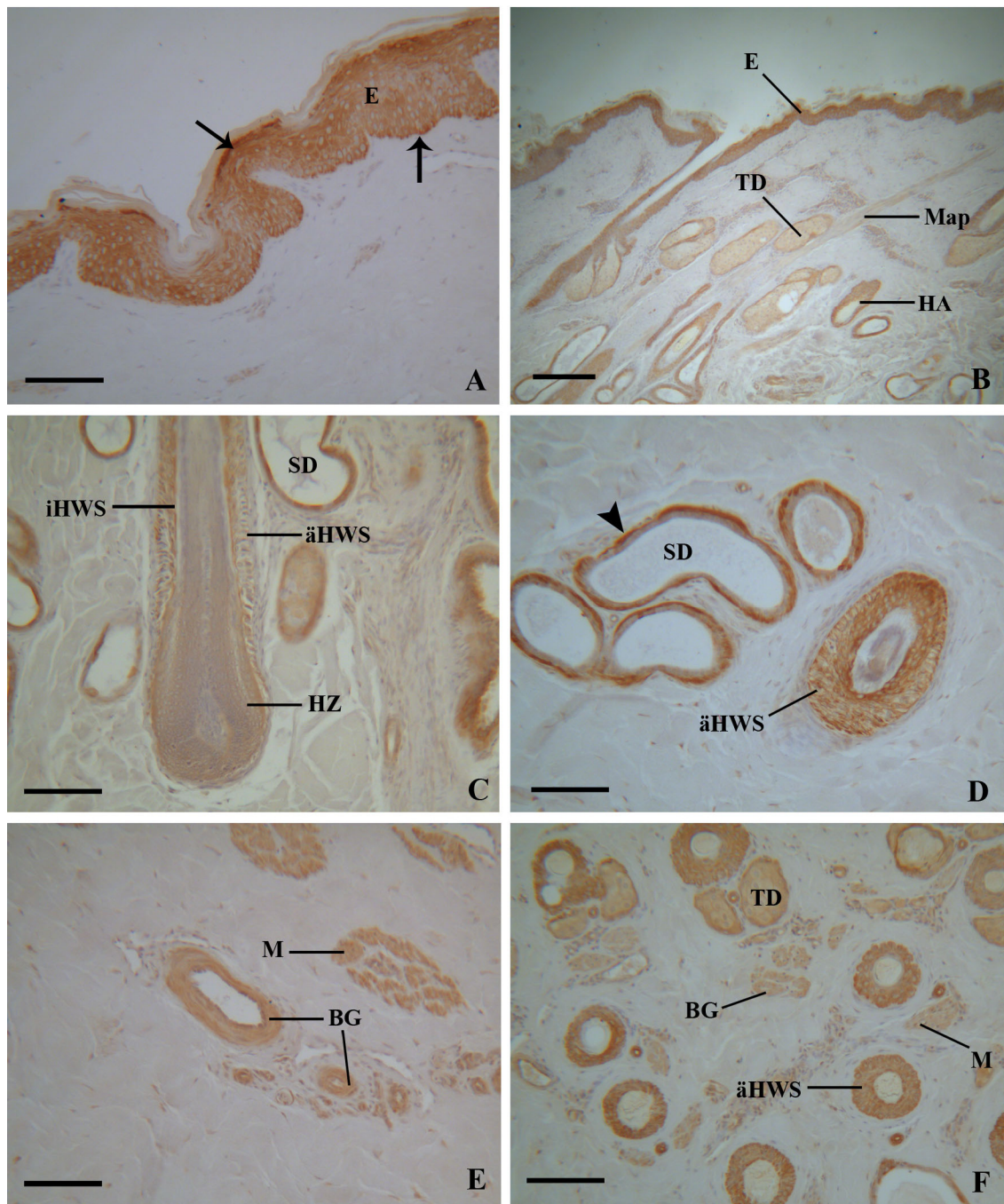
Im Rahmen dieser Arbeit kann festgestellt werden, dass COX-2 deutlich in den Zellen der Epidermis exprimiert wird. Hierbei stellen sich apikale Anteile des Stratum granulosum und basale Anteile des Stratum basale noch stärker positiv dar als der Rest (Abbildung 18: A). Die Zellen des Stratum corneums sind negativ.

Die Muskelzellen sind bei allen Tieren schwach positiv. Hierzu zählen die Tunica media der Blutgefäße, der Haarbalgmuskel und einzelne Muskelfaserbündel im Corium und in der Subkutis.

Sowohl die Schweiß- als auch die Talgdrüsen zeigen eine schwache Expression, die in den basalen Teilen der Epithelzellen und der Basalmembran etwas stärker ausgeprägt ist.

In den Haaren wird COX-2 in der inneren und in der äußeren Haarwurzelscheide exprimiert. Zudem färben sich die unteren Anteile der Haarzwiebel schwach an.



**Abb. 19: Expression von COX-2 in der Euterhaut von Kühen und Färsen**

**A: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Hinterviertels**, die Epidermis (E) zeigt starke Expression, vor allem in den basalen Bereichen des Stratum basale (Pfeil) und in apikalen Teilen des Stratum granulosum (Pfeil), SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels**, Übersicht über Epidermis und Dermis, deutlich positive Reaktion in der Epidermis (E) und den Haaren (HA), schwache Expression im Musculus arrector pili (Map) und der Talgdrüsen (TD) (hier etwas deutlicher in der Basalmembran), SB: 200µm;

**C: Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels**, ein Haar im Längsschnitt, Expression in den Schweißdrüsen (SD), der inneren Haarwurzelscheide (iHWS), der äußeren Haarwurzelscheide (äHWS) und schwache Expression in der Haarzwiebel (HZ), SB: 100µm;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels**, Haar und Schweißdrüsen (SD) im Querschnitt, Expression in der äußeren Haarwurzelscheide (äHWS) und den basalen Anteilen der Schweißdrüsenepithelzellen (Pfeilspitze), SB: 100µm;

**E: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels**, Blutgefäße und Muskelfasern im Querschnitt, Expression in der Tunica media der Blutgefäße (BG) und den Muskelzellen (M), SB: 100µm;

**F: Färse, 19 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels**, mehrere Haare mit Talgdrüsen im Querschnitt, positive Strukturen: äußere Haarwurzelscheide (äHWS) der Haare, Talgdrüsen (TD), Blutgefäße (BG), Muskelfasern (M), SB: 100µm;

**Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von COX-2 in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Reaktionsintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	2	Str. corneum neg.; basales Str. basale und apikal im Str. granulosum stärkere Expression
	Blutgefäße	1	Tunica media
	Muskelfasern	1	
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	2	Str. corneum neg.; basales Str. basale und apikal im Str. granulosum stärkere Expression
	Äußere HWS	2	
	Muskelfasern	1	
	Talgdrüse	1	v.a. BM pos.
	Schweißdrüse	1	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	2	Str. corneum neg.; basales Str. basale und apikal im Str. granulosum stärkere Expression
	Blutgefäße	1	Tunica media
	Muskelfasern	1	
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	2	Str. corneum neg.; basales Str. basale und apikal im Str. granulosum stärkere Expression
	Blutgefäße	1	Tunica media
	Äußere HWS	2	im Randbereich dunkler
	Innere HWS	2	
	Talgdrüse	1	v.a. BM pos.
	Schweißdrüse	2	v.a. basale Epithelzellen/ BM
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	2	Str. corneum neg.; basales Str. basale und apikal im Str. granulosum stärkere Expression
	Blutgefäße	1	Tunica media
	Äußere HWS	2	im Randbereich dunkler
	Innere HWS	2	
	Talgdrüse	1	v.a. BM pos.
	Schweißdrüse	2	v.a. BM

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, neg.: negativ, pos.: positiv, Str.: Stratum, v. a.: vor allem, BM: Basalmembran, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

### **3. Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen**

In diesem Abschnitt sind die Bindungen der verschiedenen Lektine an die unterschiedlichen Strukturen der Euterhaut in Übersichtstabellen und Abbildungen (für Con-A, GSL-1 und WGA) dargestellt. Wie im Kapitel 3 Material und Methoden beschrieben, wurden diverse Kontrollen durchgeführt (Negativkontrolle ohne Lektinzugabe, Positivkontrolle und Negativkontrolle mit der vorherigen Zugabe von korrespondierendem Hemmzucker und anschließend dem jeweiligen Lektin). Diese Ergebnisse wurden bei der Auswertung mit berücksichtigt. Die Negativkontrollen zeigen bei allen Proben ein negatives Ergebnis. Die Wirkung der korrespondierenden Hemmzucker sowie die Positivkontrollen fallen positiv aus.

### 3.1. Pflanzliche Glukose- bzw. Mannose-bindende Lektine

#### 3.1.1. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

**Tabelle 14: Bindungsmuster von PSA in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Str. corneum	1	
	Blutgefäße	1	BM und Gefäßendothel
	BM der Epidermis	1	
	Muskelfasern	1	Zellmembranen pos.
	Papillarkörper	2	Immunzellen und Fibrozyten
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Str. corneum	2	
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	2	BM und Gefäßendothel
	Fibrozyten	2	
	Muskelfasern	1	Zellmembranen pos.
	Talgdrüse	1	Zellmembranen pos.
	Schweißdrüsensekret	2	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Str. basale	1	
	BM der Epidermis	1	
	Haarcuticula	1	
	Talgdrüse	1	nur Zellmembranen pos.
	Schweißdrüsensekret	2	
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Str. corneum	1	
	Blutgefäße	1	BM und Gefäßendothel
	Äußere HWS	1	
	Innere HWS	1	
	Talgdrüse	1	nur Zellmembranen pos.
	Schweißdrüsensekret	1	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	
	Innere HWS	1	
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	nur Zellmembranen pos.
	Schweißdrüsensekret	2	

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinter-  
 viertel des Kuheuters, Str.: Stratum, BM: Basalmembran, pos.: positiv, 0: keine Expression, 1:  
 Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker In-  
 tensität



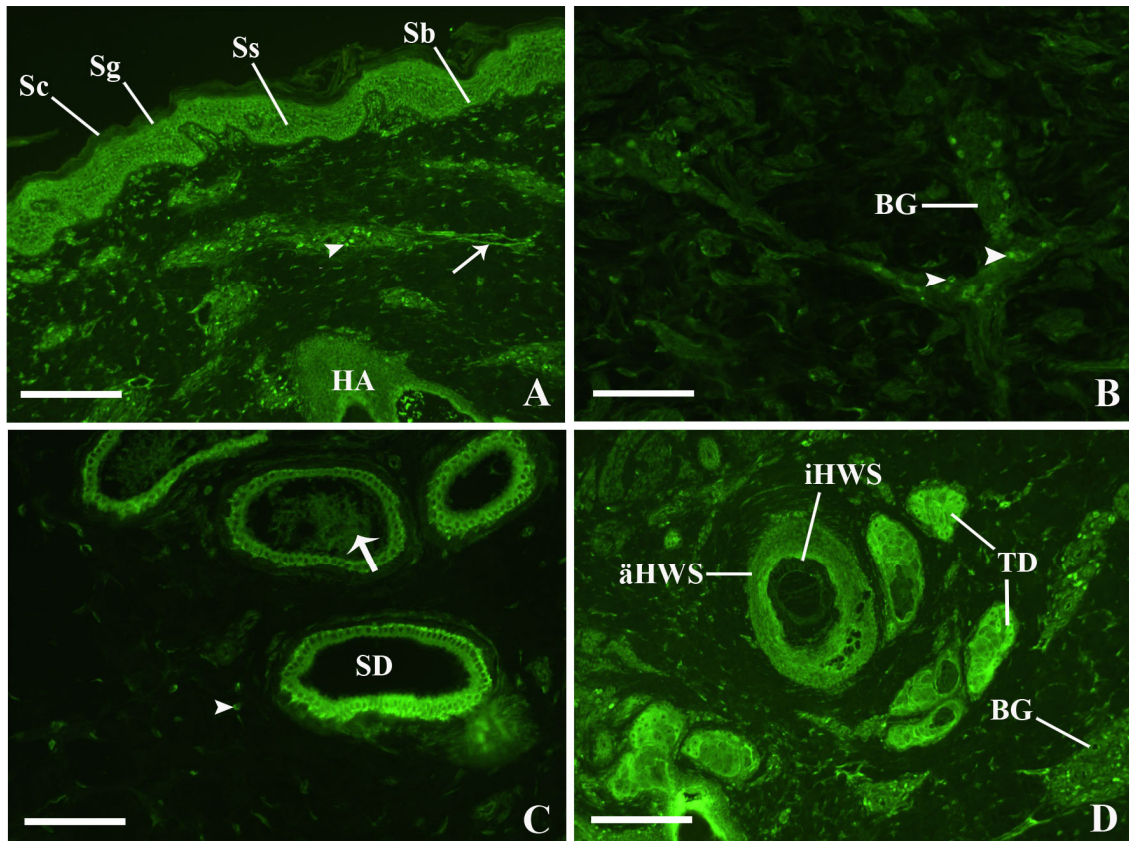
### 3.1.2. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Canavalia ensiformis* Agglutinin (ConA)

**Tabelle 15: Bindungsmuster von ConA in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	2	außer Str. corneum
	Blutgefäße	1	Endothel
	BM der Epidermis	1	BM viel dicker als an restl. Lokalisationen
	Fibrozyten	2	im Corium, v.a. um Blutgefäße herum
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	1	außer Str. corneum
	Blutgefäße	1	Endothel
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	1	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	2	Sekret: 1
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	außer Str. corneum
	Fibrozyten	3	
	Äußere HWS	1	
	Innere HWS	1	
	Haarcuticula	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	1	mit Sekret
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Innere HWS	1	
	Epidermis	2	außer Str. corneum
	Fibrozyten	2	
	Blutgefäß	1	Endothel
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	2	
	Schweißdrüse	2	mit Sekret

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, BM: Basalmembran, v.a.: vor allem, restl.: restlichen, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

**Abb. 20: Darstellung der Bindungseigenschaften von *Canavalia ensiformis* Agglutinin (Con-A) in der Euterhaut von Kühen und Färsen**



**A: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** im Stratum granulosum (Sg), Stratum spinosum (Ss) und Stratum basale (Sb) der Epidermis zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz, das Stratum corneum (Sc) ist negativ, in der Dermis kann um die Blutgefäße herum eine schwache Reaktion festgestellt werden, wobei es auch viele stark positive Fibrozyten (Pfeilspitze) gibt, das Endothel eines größeren Gefäßes (Pfeil) ist kräftig angefärbt, SB: 100µm;

**B: Färse, 26 Monate alt, Euterhaut der Zitzenspitze,** mittelstark fluoreszierende Fibrozyten (Pfeilspitzen) um Blutgefäße (BG) herum im Stratum reticulare der Dermis, SB: 100µm;

**C: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** mehrere Schweißdrüsen (SD) im Querschnitt, Schweißdrüsenepithelzellen (SD) mit starker Bindung von Con-A, das Sekret der Schweißdrüsen (Pfeil) zeigt eine schwache Fluoreszenz, einzelne Fibrozyten (Pfeilspitze) im Stratum reticulare positiv, SB: 100µm;

**D: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels,** ein Haar mit Talgdrüsen (TD) im Querschnitt, die Talgdrüse (TD) zeigt eine Fluoreszenz mittlerer Stärke, vor allem an den Zellmembranen der Epithelzellen, bei den Haaren sind sowohl die äußere (äHWS) als auch die innere Haarwurzelscheide (iHWS) positiv, bei den Blutgefäßen (BG) zeigt die Tunica interna eine positive Reaktion, einzelne Fibrozyten in der direkten Umgebung färben sich mittelstark an, SB: 100µm;

### 3.1.3. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)

**Tabelle 16: Bindungsmuster von LCA in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Str. basale	2	
	Blutgefäße	1	Endothel
	BM der Epidermis	2	
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Str. basale	1	
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	1	Endothel
	Str. retikuläre	1	diffuse Fluoreszenz, v.a. um Schweißdrüsen herum
	Schweißdrüse	1	
<b>Zitzenbasis medial</b>	Str. basale	1	
	Talgdrüse	1	
	BM der Epidermis	1	
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Str. retikuläre	1	diffuse Fluoreszenz, v.a. um Schweißdrüsen herum
	Äußere HWS	1	
	Haarcuticula	1	
	Schweißdrüsensekret und BM	1	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Str. corneum	1	
	Str. basale	1	
	BM der Epidermis	1	
	Äußere HWS	1	
	Schweißdrüsensekret und BM	1	

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, BM: Basalmembran, v.a.: vor allem, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

## 3.2. Pflanzliche D-Galaktose bindende Lektine

### 3.2.1. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Ricinus Communis* Agglutinin (RCA)

Es kann beim ersten Durchlauf eine sehr schwache Fluoreszenz der Schweißdrüsen inklusive des Sekrets bei den Proben eines adulten Tieres (Geb. 2005) festgestellt werden. Alle anderen Proben (inklusive Positivkontrolle) zeigen keinerlei Bindung von

RCA an das Euterhautgewebe. Eine Wiederholung des Versuches mit erhöhter Lektinkonzentration (10µg/ml) ergibt eine positive Reaktion an den Talgdrüsen und der inneren und äußeren Haarwurzelscheide.

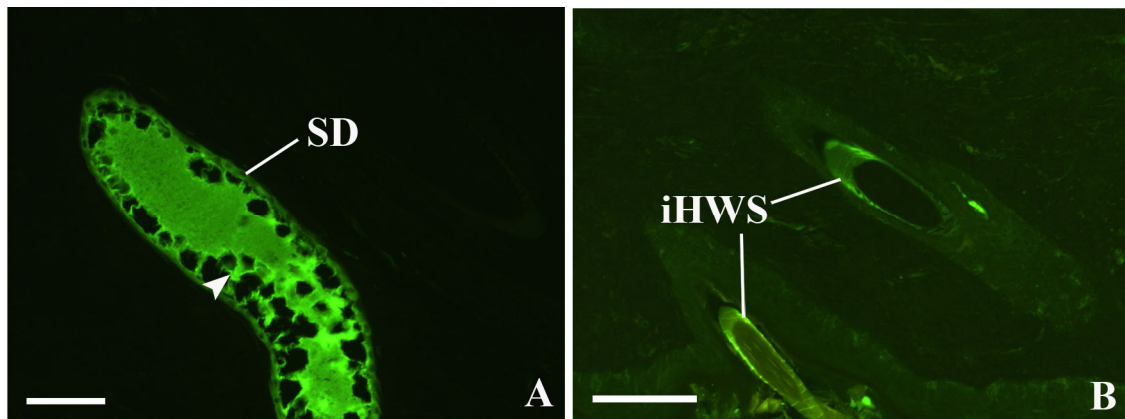
### 3.2.2. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Griffonia simplicifolia* Lektin 1 (GSL-1)

**Tabelle 17: Bindungsmuster von GSL-1 in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	2	Tunica interna
	Str. reticulare	2	Fibrozyten und subepidermale Immunzellen
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	1	Zellmembranen
	Blutgefäße	1	Tunica interna/Endothelzellen
	Schweißdrüse	1	inklusive Sekret
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	2	Endothel
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	Zellmembranen, v.a. Str. basale u. unteres Str. spinosum
	Blutgefäße	1	Endothel
	Innere HWS	2	
	Schweißdrüse	2	inklusive Sekret
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten
	Str. reticulare	1	Fibrozyten
	Innere HWS	1	
	Schweißdrüse	1	inklusive Sekret

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, BM: Basalmembran, v.a.: vor allem, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

**Abb. 21: Darstellung der Bindungseigenschaften von Griffonia simplicifolia Lektin 1 (GSL-1) in der Euterhaut von Färsen**



**A:** Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels, Schweißdrüse (SD) mit starker Fluoreszenz, vor allem das Schweißdrüsensekret (Pfeilspitze) im Lumen, SB: 25µm;

**B:** Färse, 26 Monate alt, seitliche Euterhaut des Vorderviertels, zwei Haare sichtbar, hier zeigt sich eine deutliche Bindung von GSL-1 an die innere Haarwurzelscheide (iHWS), SB: 100µm;

### 3.2.3. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Peanut Agglutinin (PNA)

Bei der Untersuchung des Bindungsmusters von PNA an der bovinen Euterhaut kann nur eine sehr schwache Fluoreszenz an den Zellmembranen der Keratinozyten der Epidermisschicht festgestellt werden. Zudem zeigen wenige Proben eine schwache Fluoreszenz der inneren Haarwurzelscheide und der Talgdrüsen.

## 3.3. Pflanzliche N-Acetyl-D-Galactosamin/D-Galactosamin bindende Lektine

### 3.3.1. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Soybean Agglutinin (SBA)

Bei der Untersuchung des Bindungsmusters von SBA an der bovinen Euterhaut kann nur eine sehr schwache Fluoreszenz an der inneren Haarwurzelscheide und den Schweißdrüsen, inklusive ihres Sekrets, festgestellt werden.

### 3.3.2. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Sophora japonica* Agglutinin (SJA)

Die Untersuchung zeigt eine sehr schwach positive Bindung von SJA bei Fibrozyten und Bindegewebsfasern des Coriums vorwiegend um die Blutgefäße herum. Des Weiteren kann eine schwache Fluoreszenz der Schweißdrüsen mit ihrem Sekret beobachtet werden.

### 3.3.3. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

**Tabelle 18: Bindungsmuster von SNA in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzen spitze</b>	Str. corneum	1	
	Str. basale	1	
	Blutgefäße	1	Endothelzellen
	Papillarkörper	1	einzelne Fibrozyten und Immunzellen
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Str. basale	1	
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	1	Endothelzellen
<b>Zitzenbasis medial</b>	Str. basale	1	
	BM	1	
	Blutgefäße	1	Tunica interna/Endothelzellen
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Str. corneum	1	
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	1	Tunica interna/Endothelzellen
	Talgdrüse	1	BM der Talgdrüse
	Äußere HWS	1	
	Innere HWS	1	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Str. corneum	1	
	Str. basale	1	
	Blutgefäße	1	Endothelzellen
	Innere HWS	1	
	Talgdrüse	1	BM der Talgdrüse

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, BM: Basalmembran, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

### 3.3.4. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Es kann keine Fluoreszenz beobachtet werden. DBA zeigt somit keinerlei Bindung an das bovine Euterhautgewebe.

### 3.4. Pflanzliche N-Acetyl-D-Glucosamin bzw. N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine

#### 3.4.1. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Wheat Germ Agglutinin (WGA)

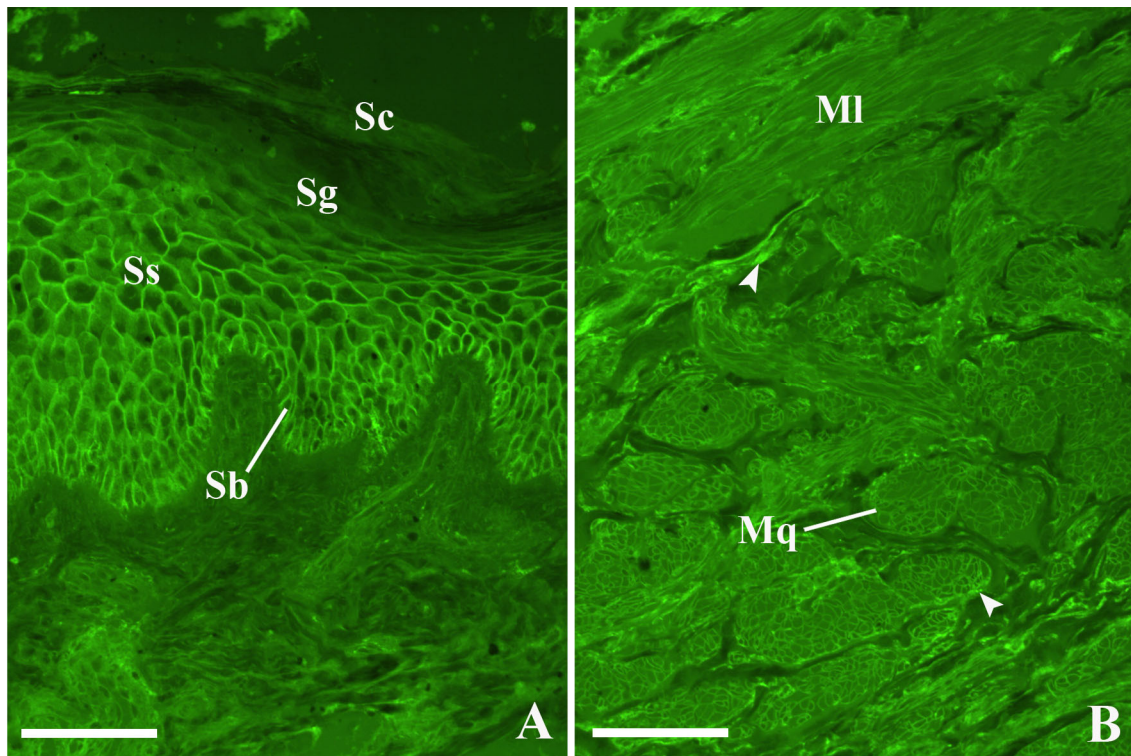
**Tabelle 19: Bindungsmuster von WGA in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	2	Zellmembranen der Keratinozyten; Str. basale etw. stärker pos.
	Blutgefäße	2	Lumen
	Muskelfasern	1	BM/Zellmembranen der Muskelzellen
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten; Str. basale etw. stärker pos.
	Muskelfasern	1	BM/Zellmembranen der Muskelzellen
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	3	mit Sekret
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten; Str. basale etw. stärker pos.
	Muskelfasern	1	BM/Zellmembranen der Muskelzellen
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	3	mit Sekret
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	2	Zellmembranen der Keratinozyten
	Talgdrüse	1	
	Innere HWS	1	v.a. Übergangsbereich zur äußeren HWS
	Äußere HWS	1	
	Dermale HWS	1	
	Schweißdrüse	3	mit Sekret
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten; Str. basale etw. stärker pos.
	Äußere HWS	1	
	Dermale HWS	1	
	Talgdrüse	1	
	Schweißdrüse	3	mit Sekret

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, pos.: positiv, v.a.: vor allem, etw.: etwas, Bdgwb.: Bindegewebe, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität



**Abb. 22: Darstellung der Bindungseigenschaften von Wheat Germ Agglutinin (WGA) in der Euterhaut von Kühen und Färsen**



**A: Kuh, 6 Jahre alt, seitliche Euterhaut des Hinterviertels,** bei den Zellen des Stratum basale (Sb) und Stratum spinosum (Ss) zeigen vor allem die Zellmembranen eine deutliche Fluoreszenz, die im Stratum granulosum (Sg) und Stratum corneum (Sc) nicht vorhanden ist, SB: 100µm;

**B: Färse, 19 Monate alt, Euterhaut der Zitzenbasis,** Darstellung von Muskelfasern im Querschnitt (Mq) und Längsschnitt (Ml) in der tieferen Dermis, vor allem die Zellmembranen der Muskelzellen (Pfeilspitzen) zeigen eine mittelstarke Reaktion, SB: 100µm;

### 3.4.2. Überprüfung der Bindungseigenschaften von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (s-WGA)

**Tabelle 20: Bindungsmuster von s-WGA in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenz-intensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	2	Zellmembranen der Keratinozyten
	Blutgefäße	2	Gefäßendothel, teilweise Lumen pos.
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	2	Zellmembranen der Keratinozyten
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos.
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel, teilweise Lumen pos.
	Talgdrüse	1	BM pos.
	Schweißdrüse	2	mit Sekret
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten
	Blutgefäße	2	Gefäßendothel, teilweise Lumen pos.
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum
	Schweißdrüse	2	mit Sekret
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	Zellmembranen der Keratinozyten
	Talgdrüse	1	BM pos.
	Innere HWS	1	
	Äußere HWS	1	
	Schweißdrüse	3	mit Sekret
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	2	Zellmembranen der Keratinozyten
	Innere HWS	1	
	Äußere HWS	1	
	Talgdrüse	1	BM pos.
	Schweißdrüse	2	mit Sekret

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, pos.: positiv, v.a.: vor allem, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

### 3.5. Pflanzliche L-Fucose bindende Lektine

#### 3.5.1. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1)

Die Untersuchung des Bindungsmusters von UEA-1 an das bovine Euterhautgewebe zeigt eine schwache Fluoreszenz von Fibrozyten und Immunzellen im Stratum papillare sowie in einigen Bereichen des Stratum corneum. Bei einem Tier zeigt sich eine schwache Bindung von UEA-1 an die innere Haarwurzelscheide.

### 3.6. Pflanzliche Lektine mit Oligosaccharidbindungsstellen

#### 3.6.1. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)

**Tabelle 21: Bindungsmuster von PHA-L in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzen spitze</b>	Epidermis	1	Zellmembranen
	BM der Epidermis	1	
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos.
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	1	Zellmembranen
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos.
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	Zellmembranen
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	Str. corneum mittelstark pos. (2)
	BM der Epidermis	1	
	Str. papillare	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum
	Innere HWS	1	
	Äußere HWS	1	
	Dermale HWS	1	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	
	Innere HWS	1	

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, pos.: positiv, v.a.: vor allem, BM: Basalmembran, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

### 3.6.2. Überprüfung der Bindungseigenschaften von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

**Tabelle 22: Bindungsmuster von PHA-E in der bovinen Euterhaut**

Lokalisation	Positive Strukturen	Fluoreszenzintensität	Besonderheiten
<b>Zitzenspitze</b>	Epidermis	1	Zellmembranen, v.a. Str. basale
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel
	Papillarkörper	2	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos.
<b>Zitzenbasis lateral</b>	Epidermis	2	Zellmembranen, v.a. Str. basale und unteres Str. spinosum
	Str. papillare	2	einzelne Fibrozyten, Immunzellen und Bdgwb. Fasern pos.
	Talgdrüsen	1	
	Schweißdrüsen	2	
	Blutgefäße	2	Gefäßendothel
<b>Zitzenbasis medial</b>	Epidermis	1	Zellmembranen
	BM der Epidermis	1	
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel
	Schweißdrüsen	1	
	Talgdrüsen	1	
	Str. papillare	1	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum, Bdgwb. Fasern pos.
<b>Laterale Euterhaut re VV</b>	Epidermis	1	
	BM der Epidermis	1	
	Str. papillare	1	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel
	Talgdrüsen	1	
	Schweißdrüsen	2	inklusive Sekret
	Innere HWS	1	
	Äußere HWS	1	
<b>Laterale Euterhaut li HV</b>	Epidermis	1	Zellmembranen
	Blutgefäße	1	Gefäßendothel
	Str. papillare	1	einzelne Fibrozyten und Immunzellen pos., v.a. um Blutgefäße herum
	Dermale HWS	1	
	Innere HWS	1	

HWS: Haarwurzelscheide, re: rechts, li: links, VV: Vorderviertel des Kuheuters, HV: Hinterviertel des Kuheuters, Str.: Stratum, pos.: positiv, v.a.: vor allem, BM: Basalmembran, Bdgwb.: Bindegewebe, 0: keine Expression, 1: Expression schwacher Intensität, 2: Expression mittlerer Intensität, 3: Expression starker Intensität

### **3.6.3. Überprüfung der Bindungseigenschaften von *Maackia amurensis* Agglutinin 1 (MAA-1)**

Bei der Untersuchung des Bindungsmusters von MAA-1 in der bovinen Euterhaut kann eine schwache Fluoreszenz an der inneren Haarwurzelscheide, dem Blutgefäßendothel und den Talgdrüsen beobachtet werden. Zudem kann eine schwache Bindung von MAA-1 an einzelnen Fibrozyten in der Dermis nachgewiesen werden.

## **4. Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen**

Die Ergebnisse der Transmissionselektronenmikroskopie der bovinen Euterhaut werden in diesem Kapitel gesondert nach Ergebnissen der Epidermis und Ergebnissen der Dermis dargestellt.

### **4.1. Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung der bovinen Epidermis**

Die Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung sind hier nach der Anordnung der Epidermisschichten von außen nach innen (vom Stratum corneum bis zum Stratum basale bzw. zur Basalmembran) aufgelistet.

#### **4.1.1. Das Stratum corneum und das Stratum granulosum**

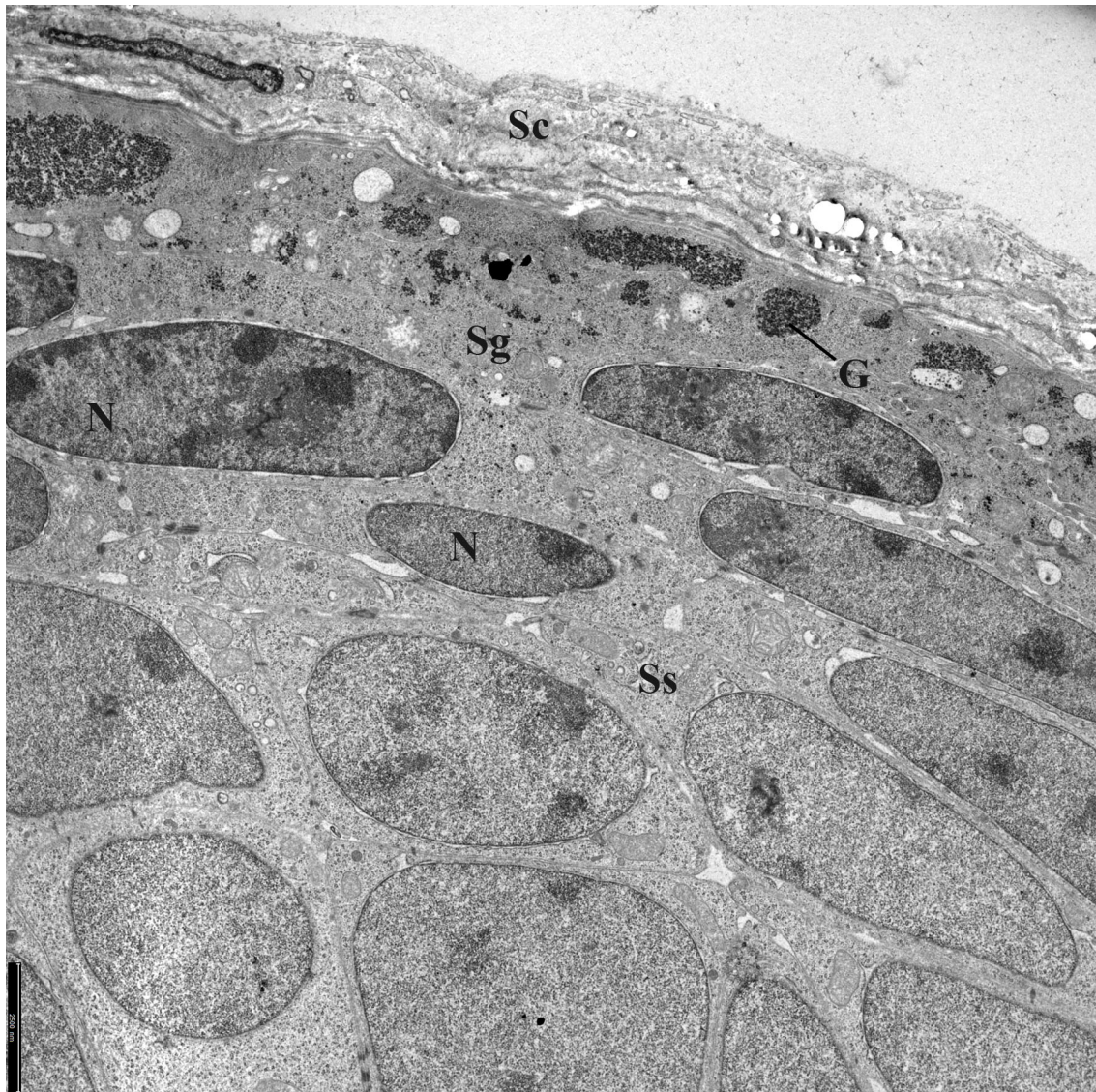
Das Stratum corneum der Epidermis ist vollständig keratinisiert und besteht aus mehreren Zellschichten. Die einzelnen Zellen besitzen eine unregelmäßige Oberfläche durch die es zu einer festen Verzahnung zwischen den Zellen kommt.

Die Keratinozyten des darunter liegenden Stratum granulosum sind gekennzeichnet durch zytoplasmatische Einlagerungen von viel Glykogen. Die Zellen besitzen eine längsovale Form mit einem horizontal zur Basalmembran ausgerichteten, gleichmäßig längsovalen Zellkern. Dieser weist viel Heterochromatin auf und stellt sich elektronendichter dar als der des basal anschließenden Stratum spinosum. In Abbildung 25 (Detail) ist der mehrschichtige Aufbau der Kernmembran eines Keratinozyten dargestellt.

Im Zytoplasma einiger Zellen lassen sich elektronendichte Keratohyalinvesikel erkennen (Abbildung 25). Die übrigen Zellorganellen sind bis auf wenige Mitochondrien nicht mehr vorhanden. Zwischen den Zellen des Stratum granulosum und zum darunter liegenden Stratum spinosum sind Desmosomen vorhanden. Zur Verzahnung der Zellen untereinander sind einige Interdigitationen der Zellmembranen zu beobachten (Abbildung 24: Detail). Auffallend sind vereinzelte wenig elektronendichte runde Zellorganellen im Zytoplasma, bei denen es sich vermutlich um zugrunde gehende Zellorganellen handelt.



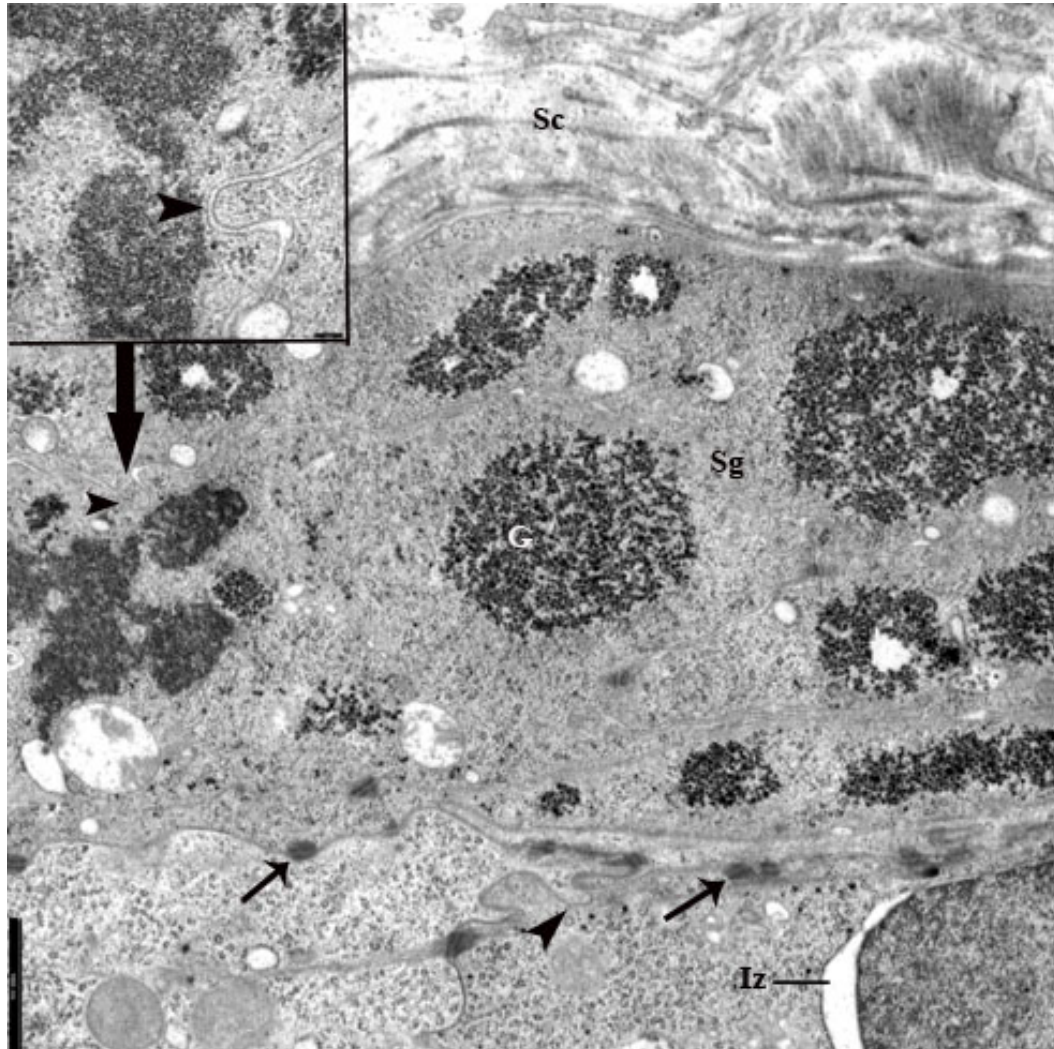
**Abb. 23: Übersicht über die apikalen Zellschichten der bovinen Epidermis (Hautlokalisation: Euterhaut, seitliches Hinterviertel)**



In dieser Übersicht sind die ersten drei Schichten der Epidermis dargestellt: Stratum corneum (Sc), Stratum granulosum (Sg) und Stratum spinosum (Ss). Die Zellen des Stratum corneums (Sc) sind vollständig keratinisiert und werden auch als Korneozyten bezeichnet. Im Zytoplasma der Zellen des Stratum granulosum (Sg) sind Ansammlungen von Glykogen (G) zu beobachten. Die Zellkerne (N) besitzen eine gleichmäßige längsovale Form. Im Gegensatz dazu sind die Zellen und Zellkerne des Stratum spinosum (Ss) rund bzw. polymorph, es ist kein Glykogen vorhanden. Die Zellkerne des Stratum spinosum sind weniger elektronendicht als die des Stratum granulosum; SB: 2,5µm

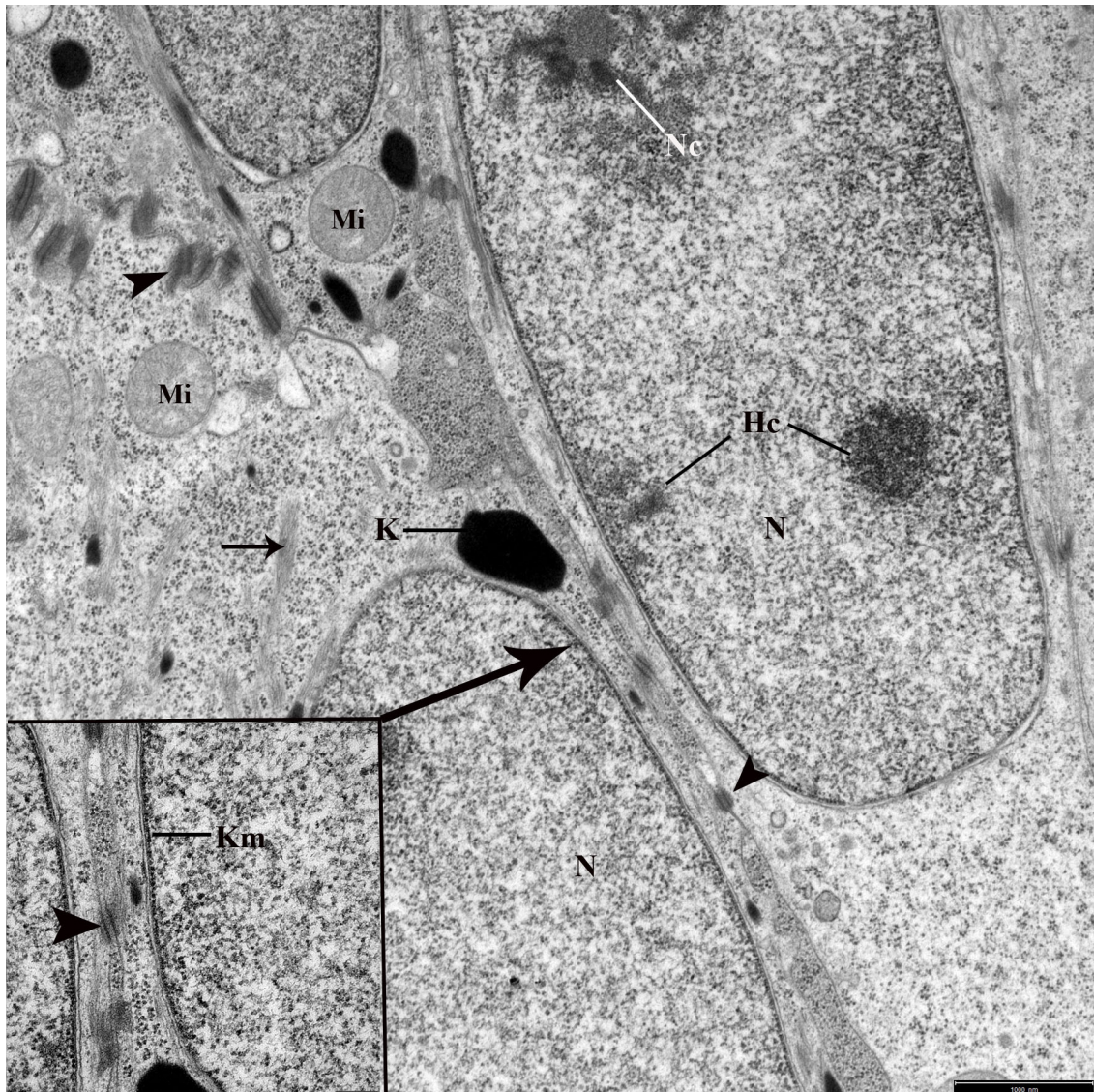


**Abb. 24: Detailansicht der apikalen bovinen Epidermis (Abbildung 23) (Hautlokalisation: Euterhaut, seitliches Hinterviertel)**



Die Zellen des Stratum granulosum (Sg) und Stratum spinosum sind partiell über Interdigitationen (Pfeilspitzen) miteinander verzahnt (siehe auch Detail oben links). Am Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum spinosum sind die Zellen durch viele Desmosomen (Pfeile) miteinander verbunden. Das Glykogen (G) im Zytoplasma der Zellen des Stratum granulosum stellt sich sehr elektronendicht dar. Im Stratum spinosum stellen sich verbreiterte Interzellularräume (Iz) dar; SB (Übersicht): 1µm, SB (Detail): 0,1µm

**Abb. 25: Ausschnitt aus dem Stratum granulosum der bovinen Epidermis (Haut-lokalisation: Euterhaut seitliches Hinterviertel)**



Darstellung von drei aneinander grenzenden Zellen des Stratum granulosum. Auffällig sind die zahlreichen Desmosomen (Pfeilspitzen) zur Verzahnung der Zellen miteinander. Die Zellkerne (N) enthalten Heterochromatin (Hc) das sich sowohl kernmembranständig, als auch frei bzw. um den Nucleolus (Nc) herum sammelt. Die Kernmembran (Km) besitzt wie im Detail unten links ersichtlich einen zweischichtigen Aufbau aus einer inneren und einer äußeren Membran mit einem dazwischenliegenden leer erscheinenden perinukleären Raum. Vereinzelt gibt es im Zytoplasma der Zellen Keratohyalinvesikel (K) die sich amorph darstellen und Zytokeratinfilamente (Pfeil). Gut zu erkennen sind einige Mitochondrien (Mi); SB (Übersicht): 1µm, SB (Detail): 0,25µm

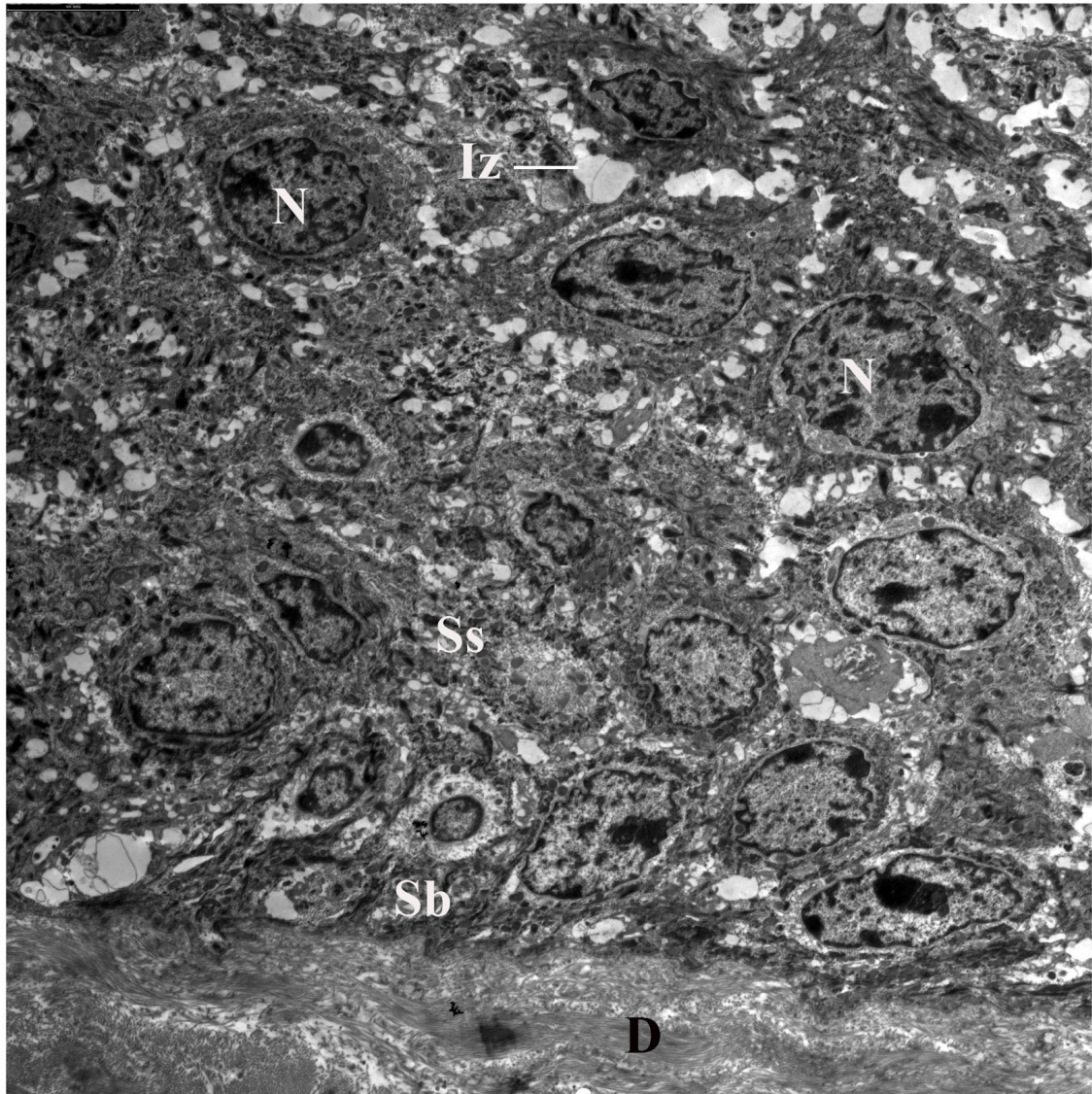
#### 4.1.2. Das Stratum spinosum

Das Stratum spinosum, auch *Stachelzellschicht* genannt, ist charakterisiert durch stark verbreiterte Interzellularräume (Abbildung 27). Zwischen den verbreiterten Bereichen treten die Zellen über viele Desmosomen in Kontakt und werden so fest miteinander verbunden. Ebenfalls zur besseren Verzahnung der Zellen untereinander sind einige Interdigitationen vorhanden. Von den Desmosomen strahlen zahlreiche Keratinfilamente in die Zelle und bilden das Zellskelett. Mehrere zu großen Bündeln zusammengefügte Keratinfilamente werden als Tonofilamente bezeichnet und stellen sich stark elektronendicht dar. Sie erschweren in einigen Bereichen die Beurteilung der übrigen Zellorganellen. Glykogen fehlt im Zytoplasma des Stratum spinosum. Die Zellen des Stratum spinosum sind arm an Zytoplasma und haben runde Zellkerne, die wenig Heterochromatin und ein bis drei Nucleoli enthalten. Die Zellkerne zeigen eine homogene Verteilung von Eu- und Heterochromatin und nehmen einen Großteil der Zelle ein. Perinukleär fällt eine Aufhellung des Zytoplasmas und das Fehlen von Keratinfilamenten auf (Abbildung 28).

Vereinzelt sind im Stratum spinosum antigenpräsentierende Langerhans Zellen zu beobachten (Abbildung 29). Ihr Zytoplasma ist deutlich weniger elektronendicht als das der Keratinozyten. Die vereinzelt vorkommenden dunklen Vesikel im Zytoplasma werden als Birbeck-Granula bezeichnet. Die übrigen Zellorganellen wie Golgiapparat, raues Endoplasmatisches Reticulum und Mitochondrien liegen perinukleär im Zytoplasma. Der Zellkern stellt sich gelappt oder mit wenigen Einbuchtungen dar und enthält viel Heterochromatin. Die Zelle lässt sich sehr gut von den übrigen Keratinozyten abgrenzen und besitzt keine Desmosomen als Verbindung zu den Nachbarzellen.



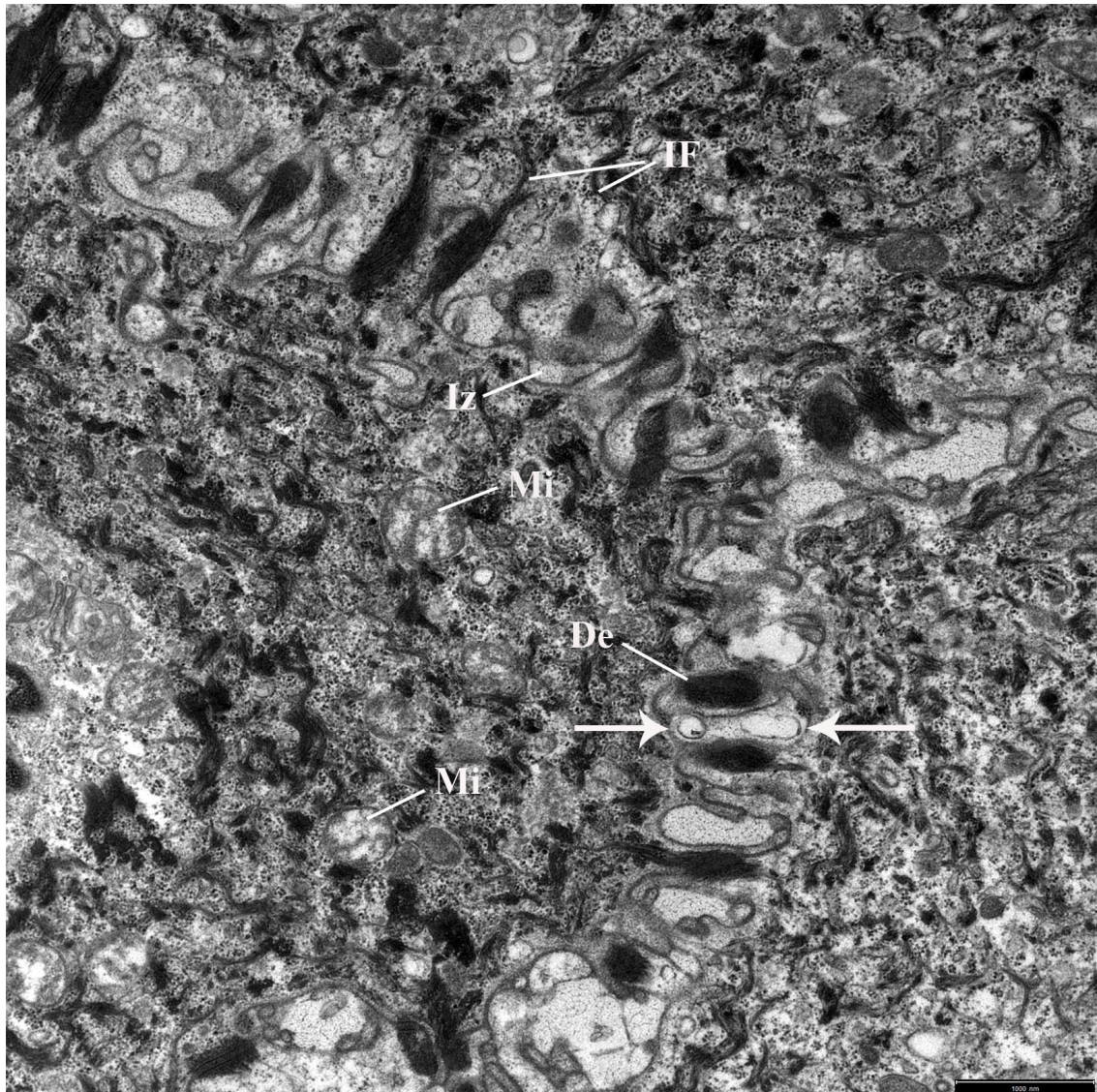
**Abb. 26: Übersicht über das Stratum spinosum und das Stratum basale der bovinen Epidermis (Hautlokalisation: Zitzenspitze)**



Diese Übersicht zeigt den Übergang von der Dermis (D) zur Epidermis und die Keratinozyten des Stratum basale (Sb) und Stratum spinosum (Ss). Im mehrschichtigen Stratum spinosum sieht man die charakteristischen verbreiterten Interzellularräume (Iz) zwischen den einzelnen Keratinozyten, die im apikalen Bereich noch breiter werden als im basalen. Untereinander sind die Zellen über zahlreiche Desmosomen verbunden. Die Zellen haben eine runde bzw. polymorphe Form. Die Zellkerne (N) haben eine runde Form mit vielen kleinen Einbuchtungen und nehmen einen Großteil der Zelle ein. Es sind ein bis drei Nucleoli im Zellkern vorhanden, die sich stark elektronendicht darstellen. Die restlichen Anteile des Zellkerns erscheinen relativ hell und sind somit arm an Heterochromatin; SB: 5µm



**Abb. 27: Detailansicht der Zell-/Zellkontakte der Keratinozyten des Stratum spinosum (Hautlokalisation: bovine Zitzenspitze)**



Darstellung der Zell-/Zellkontakte der Keratinozyten des Stratum spinosum. Die Interzellularräume (Iz) sind deutlich erweitert. Ein Stofftransport durch Vesikel (Pfeile) von einer Zelle zur Anderen über den Interzellularraum lässt sich beobachten. Im Zytoplasma der Zellen sind zahlreiche Intermediärfilamente (IF) vorhanden, die an den Desmosomen (De) verankert sind. Zudem sind einige Mitochondrien (Mi) sichtbar; SB: 1µm



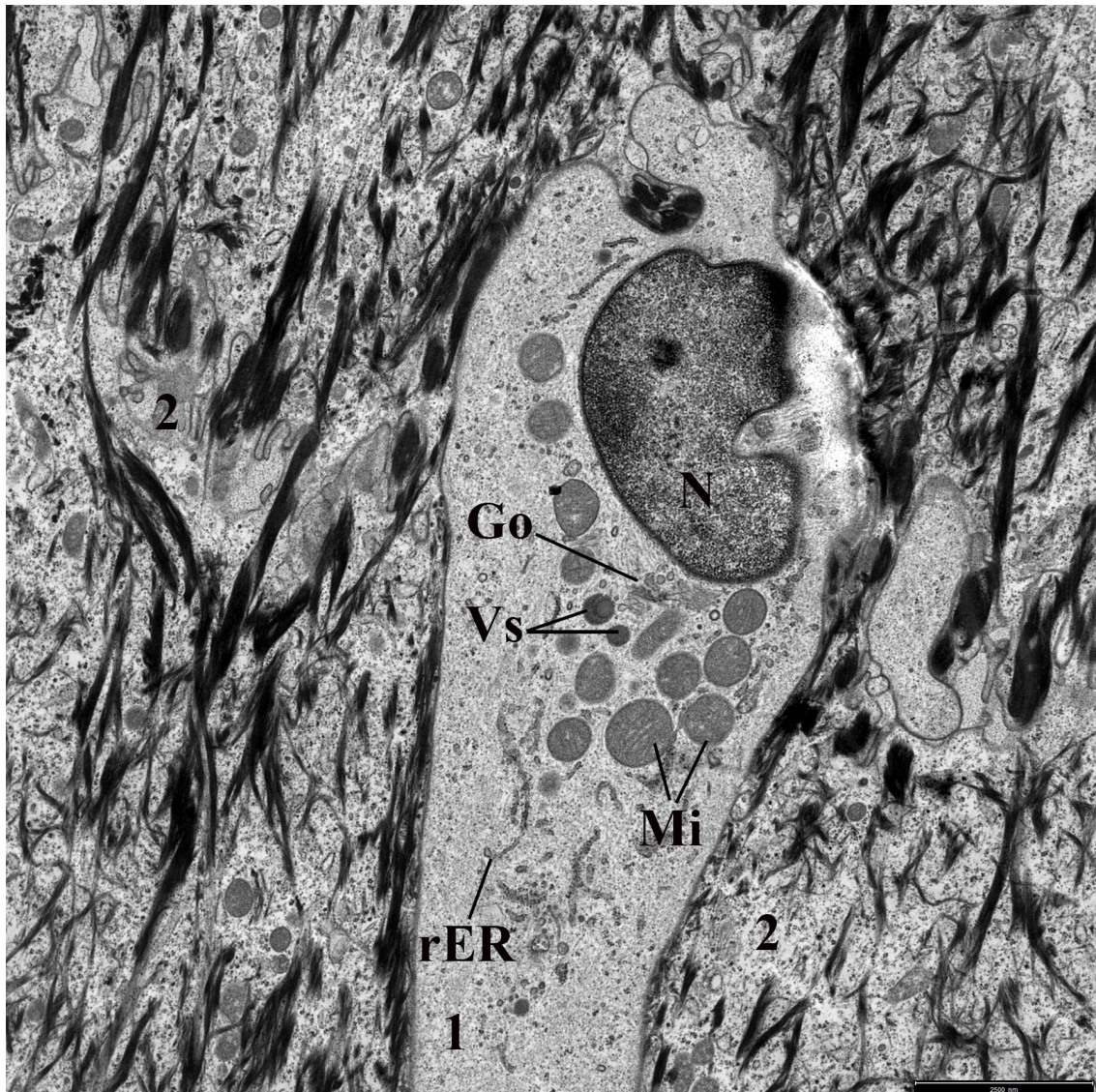
**Abb. 28: Keratinfilamente der Keratinozyten des Stratum spinosum (Hautlokalisierung: bovine Zitzenbasis)**



Zahlreiche Keratinfilamente (KF), die das Zytoskelett der Zellen bilden, sind in dieser Abbildung sichtbar. Sie erschweren die Beurteilung der übrigen Zellorganellen im Zytoplasma. Die größeren Bündel der Keratinfilamente werden als Tonofilamente bezeichnet. An den Zellgrenzen sind viele Desmosomen (Pfeilspitze) im breiten Interzellularraum (Iz) vorhanden. Die Zellkerne (N) zeigen ein homogenes Aussehen und sind wenig elektronendicht, was auf einen großen Anteil an Euchromatin schließen lässt. Der elektronendichte Nucleolus (Nc) ist gut erkennbar. Perinukleär fällt eine Aufhellung des Zytoplasmas (Pfeil) und das Fehlen von Keratinfilamenten auf; SB: 2,5µm



**Abb. 29: Langerhans Zelle im Stratum spinosum (Hautlokalisation: bovine Zit-zenbasis)**



Die antigenpräsentierende Langerhans Zelle (1) lässt sich durch ihr wenig elektronendichtes Zytoplasma gut von den benachbarten Keratinozyten (2) des Stratum spinosum abgrenzen. Gut zu erkennen sind die einzelnen Zellorganellen im Zytoplasma: raues Endoplasmatisches Retikulum (rER), Mitochondrien (Mi), Golgi-Apparat (Go) und Sekretvesikel (Vs), die in dieser Zellenart Birbeck-Granula genannt werden. Der Zellkern (N) ist sehr elektronendicht, also reich an Heterochromatin und zeigt eine gelappte Form. Es ist ein Nucleolus sichtbar; SB: 2,5µm



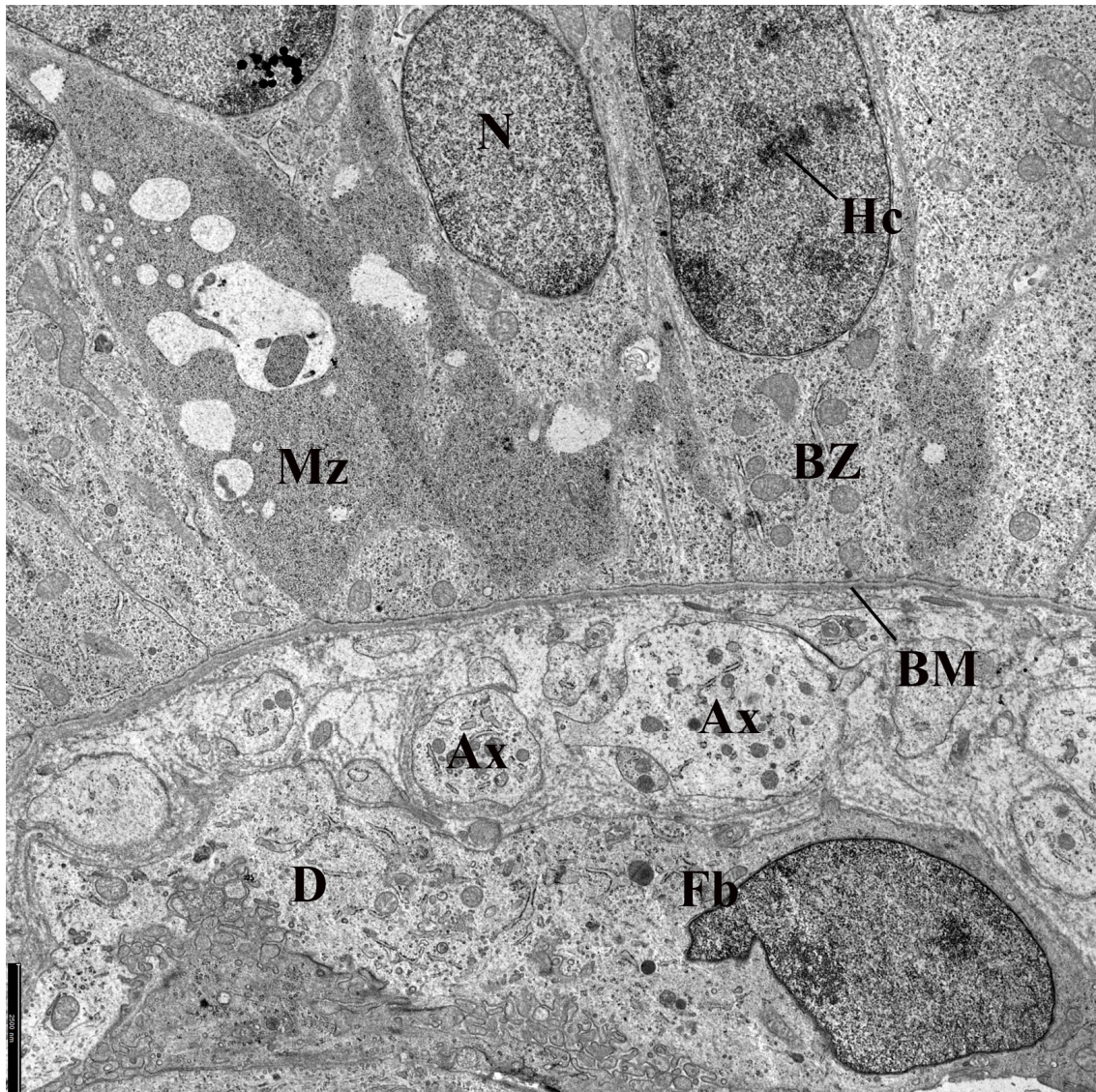
#### **4.1.3. Das Stratum basale und die Basalmembran**

Das Stratum basale der bovinen Epidermis der Euterhaut ist ein einschichtiges Epithel mit vorwiegend hochprismatischen Zellen, den Keratinozyten, die direkt der Basalmembran aufliegen und mit ihr über Hemidesmosomen verbunden sind. Die Basalmembran zeigt einen leichtgradig geschlängelten Verlauf. Die Basalzellen besitzen relativ wenig Zytoplasma und Zellkerne mit homogener längsovaler Form undmäßigem Heterochromatingehalt. Es sind ein bis drei Nucleoli zu beobachten. Im Zytoplasma der Zellen lassen sich wenige runde und ovale Mitochondrien, ein ausgeprägtes raues Endoplasmatisches Retikulum und einzelne Vesikel erkennen.

In den Proben meiner ultrastrukturellen Untersuchung ließen sich keine Melanozyten im Stratum basale nachweisen, jedoch wenige Melanosomen im Zytoplasma einiger Keratinozyten.

Vereinzelt sind im Stratum basale die als Druckrezeptoren in der Haut dienenden Merkelzellen vorhanden (Abbildung 30). Sie besitzen typische fingerförmige Ausläufer, die sich nach apikal in Richtung Stratum spinosum erstrecken. Die Elektronendichte ihres Zytoplasmas unterscheidet sich deutlich von der der Keratinozyten.

**Abb. 30: Stratum basale und Merkelzelle in der bovinen Epidermis (Hautlokalisierung: Euterhaut seitliches Hinterviertel)**



Die Basalmembran (BM) ist deutlich erkennbar und trennt die Basalzellen (BZ) der Epidermis von der Dermis (D). Subepithelial liegen mehrere Nervenaxone (Ax). Direkt darunter ist ein Fibroblast (Fb) mit eingebuchtetem Zellkern sichtbar. Die Zellen des Stratum basale (BZ) haben eine hochprismatische Form mit einem längsovalen Zellkern (N). Es sind Ansammlungen von Heterochromatin (Hc) vorhanden. Bei der dunkelgrauen Zelle links neben den zwei Basalzellen handelt es sich höchst wahrscheinlich um eine Merkelzelle (Mz). Der typische gelappte Zellkern ist leider nicht sichtbar, jedoch die fingerförmigen Ausläufer, die sich Richtung apikal erstrecken; SB: 2,5µm

## **4.2. Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung der bovinen Dermis**

### **4.2.1. Übersicht über die bovine Dermis**

In der hellen, wenig elektronendichten Grundsubstanz der Dermis gibt es verschiedene ortständige und freie Strukturen bzw. Zellen zu beobachten. Relativ häufig ist das Vorkommen von Bindegewebszellen wie Fibroblasten und Fibrozyten. Die Fibroblasten besitzen vorwiegend eine rundliche Form mit einem runden Zellkern, der einen hohen Heterochromatingehalt aufweist. Der Zytoplasmagehalt der Zelle ist deutlich höher als bei Fibrozyten. Ebenso der Anteil an Zellorganellen. Es lassen sich große Mengen an rauem Endoplasmatischem Retikulum, Ribosomen, zytoplasmatischen Vesikeln und Mitochondrien erkennen. Die Fibrozyten haben eine länglich spindelförmige Form (Abbildung 36). Sie besitzen charakteristischer Weise einen oder mehrere unbewegliche Zellfortsätze (Processus cellularis) und relativ wenig Zytoplasma und Zellorganellen. Ihr Zellkern besitzt ebenso wie die gesamte Zelle eine längliche Form.

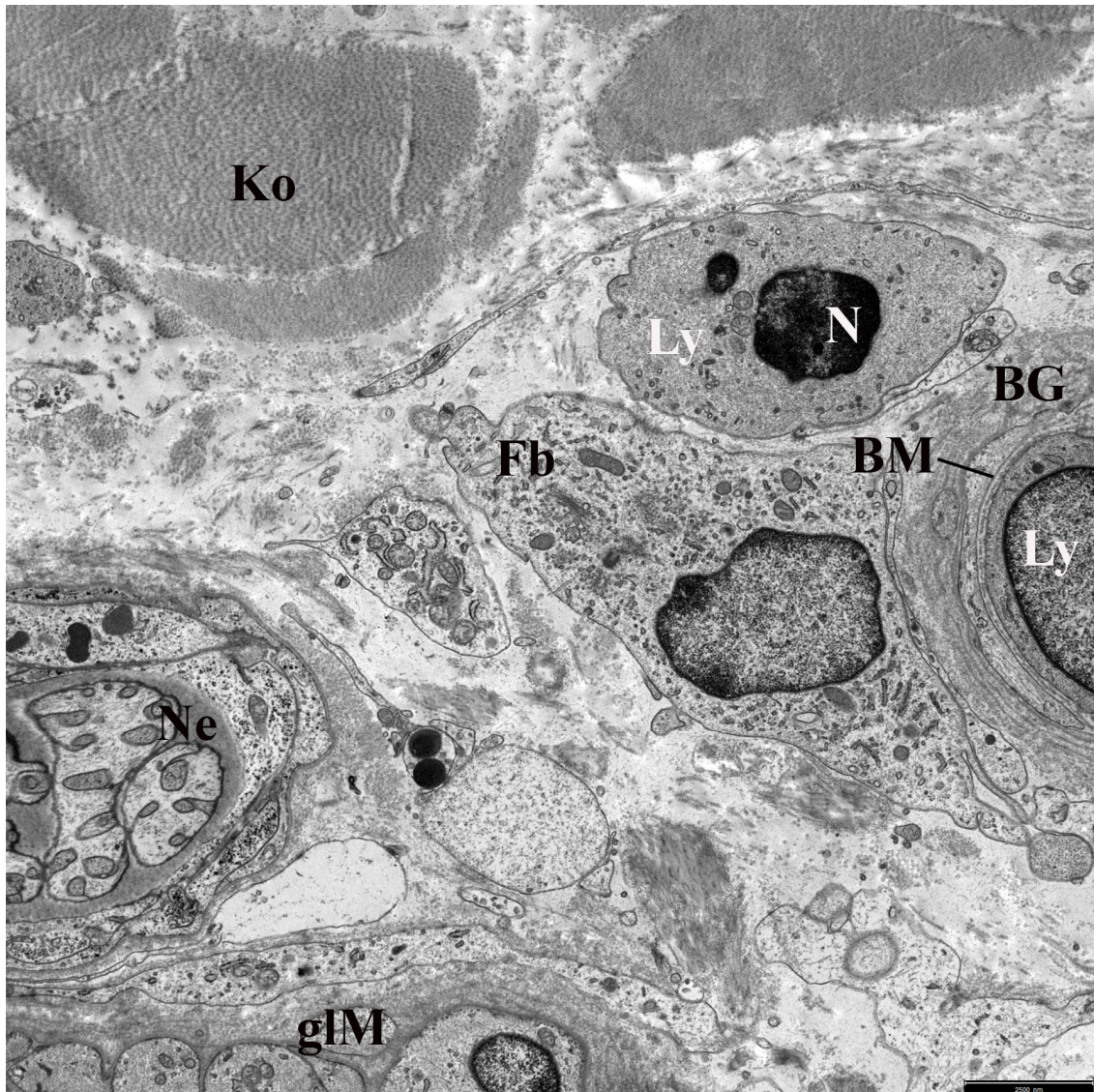
Neben den Bindegewebszellen gibt es eine große Anzahl an Kollagenfibrillen, die sich zu Kollagenfasern zusammenschließen (Abbildung 31). Sie sind im elektronenmikroskopischen Präparat sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt vorhanden und stellen sich schwach elektronendicht dar.

Vereinzelt konnten in der Dermis freie Zellen, wie z. B. Lymphozyten, Plasmazellen oder Mastzellen, vor allem perivaskulär beobachtet werden (Abbildung 31 und 36). Die Lymphozyten haben eine runde Form und einen gleichmäßig runden Zellkern, der den Großteil der Zelle einnimmt (vgl. Abbildung 31 Zelle rechts im Bild). Die Ultrastruktur der Mastzellen wird im Abschnitt 4.2.4 genauer dargestellt.

Weitere vorhandene Strukturen und Zellen, wie die Blutgefäße, die Nerven, die Talgdrüsen und die glatten Muskelzellen werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.



**Abb. 31: Ortsständige Strukturen und freie Zellen im Bindegewebe der Euterhaut (Hautlokalisation: Zitzenbasis)**



Diese Übersicht zeigt mehrere Kollagenfibrillen, die einzelne Kollagenfasern (Ko) bilden, eine ortsständige Bindegewebszelle (Fibroblast (Fb)), einen ins Bindegewebe migrierten Lymphozyten (Ly), einen Lymphozyten (Ly) im Lumen eines Blutgefäßes (BG), einen Nerven (Ne) im Querschnitt und Zellen der glatten Muskulatur (glM). Der freie Lymphozyt im Bindegewebe hat einen stark elektronendichten Zellkern (N). Der Lymphozyt in dem Blutgefäß hat einen großen Zellkern, der fast die gesamte Zelle einnimmt. Gut zu sehen ist die Basalmembran (BM) des Blutgefäßes, die direkt an den Lymphozyten angrenzt; SB: 2,5µm

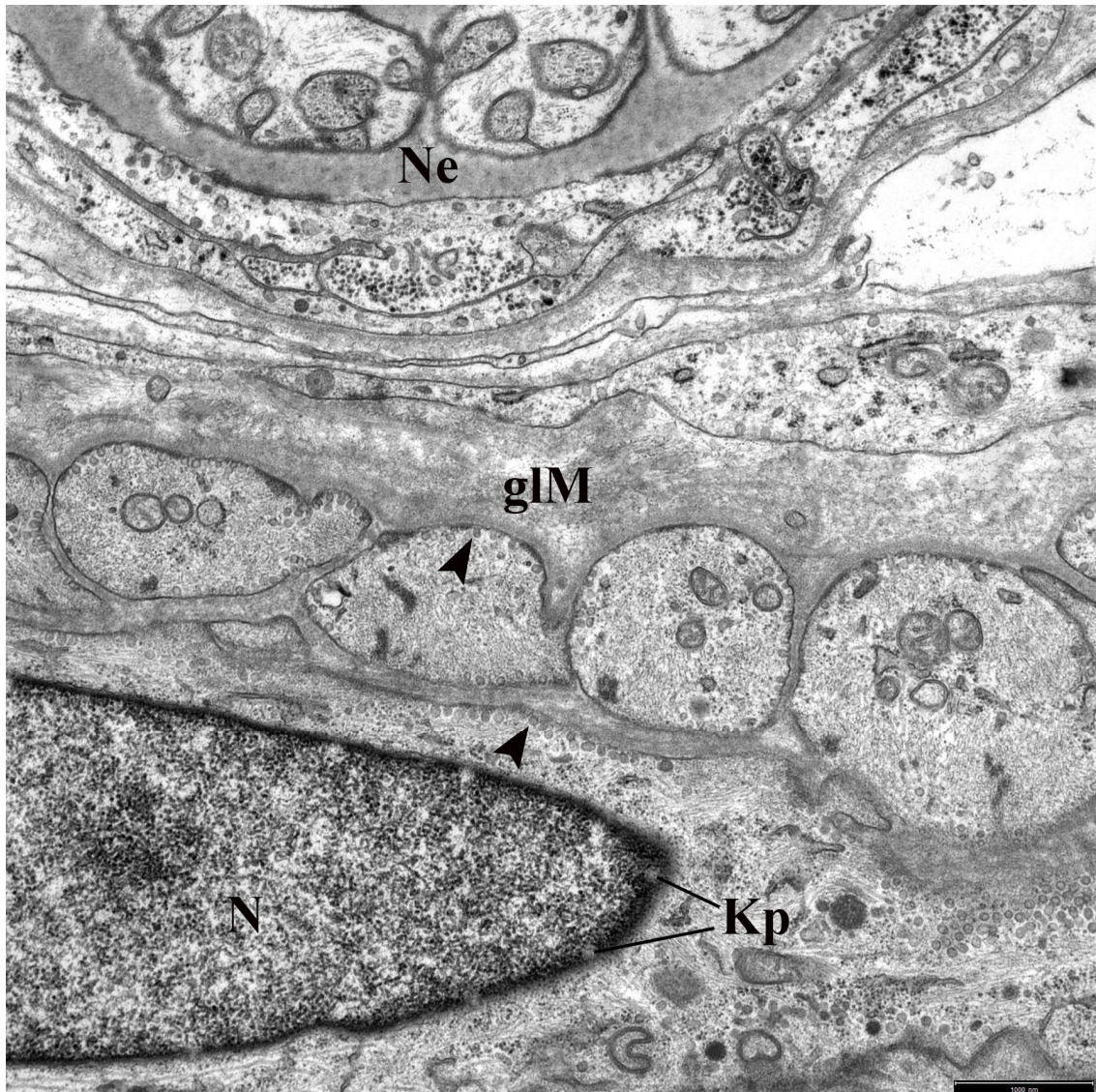
#### **4.2.2. Muskelzellen**

Die Muskelfasern in der bovinen Dermis der Euterhaut bestehen aus mehreren Schichten von glatten Muskelzellen, die abwechselnd im Quer- und im Längsschnitt sichtbar sind (Abbildung 32). Die Zellen im Längsschnitt weisen einen länglich-ovalen Zellkern mit einem mäßigen Heterochromatingehalt auf. An der Kernmembran des Zellkerns sind sehr gut die hellen Kernporen sichtbar. Im Zytoplasma lassen sich einige Myofilamente, die normalerweise aus Aktin und Myosin bestehen, erkennen. Zudem gibt es zahlreiche für glatte Muskelzellen charakteristische Caveolen, die vorwiegend membranständig vorhanden sind.

Zur Oberflächenvergrößerung und Verzahnung der Zellen untereinander sind Interdigitationen zwischen den glatten Muskelzellen ausgebildet (Abbildung 33).



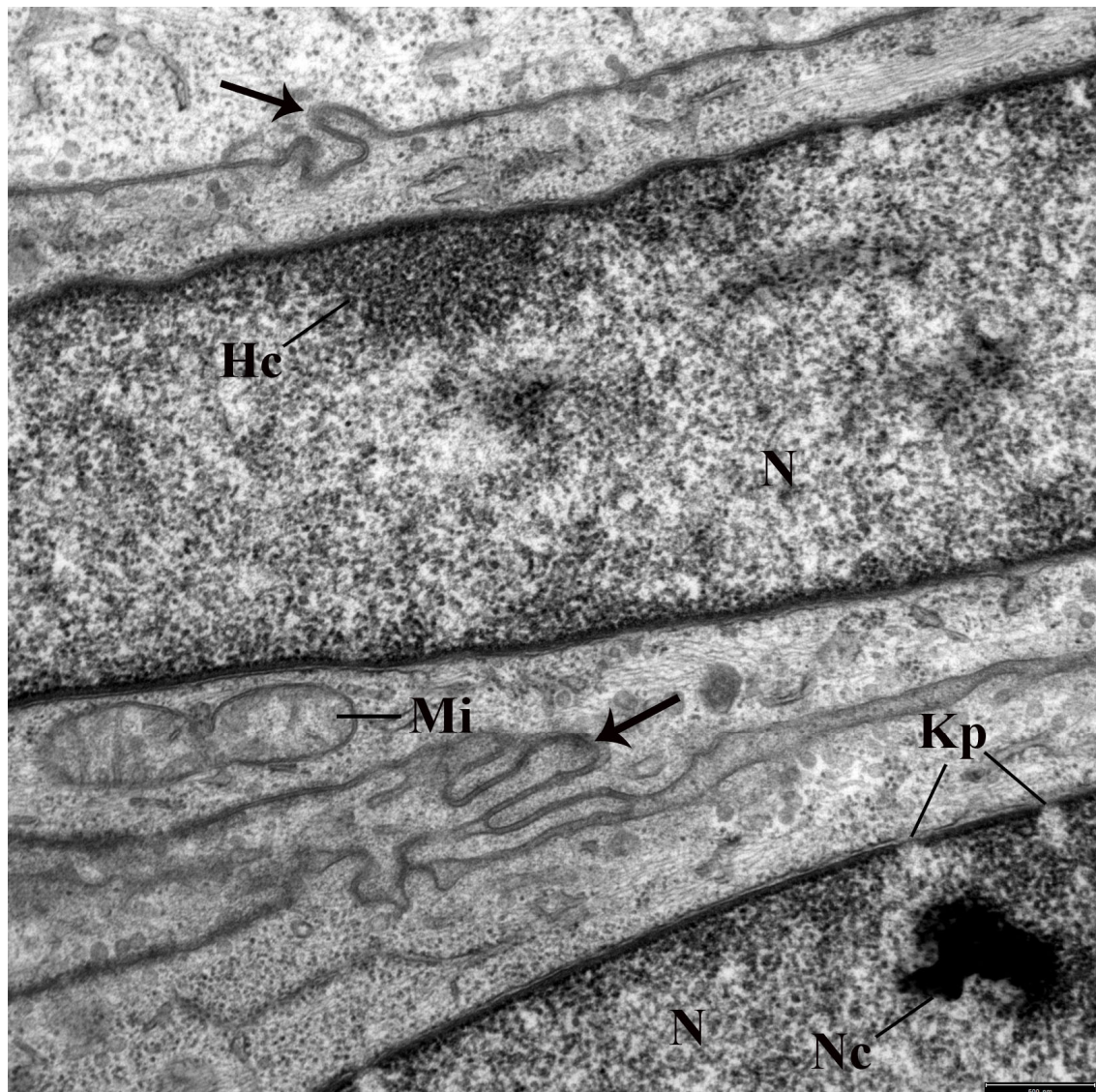
**Abb. 32: Glatte Muskulatur in der bovinen Dermis der Euterhaut (Hautlokalisation: Zitzenbasis)**



Diese Abbildung zeigt die Dermis im subepithelialen Bereich. Im oberen Teil des Bildes sieht man einen Nerv (Ne) im Querschnitt mit darunter liegenden glatten Muskelzellen (glm). An den Zellmembranen der glatten Muskelzellen und teilweise intrazellulär sind viele alveoläre Caveolen (Pfeilspitzen) sichtbar. Sie erinnern in ihrem Erscheinungsbild an pinozytotische Vesikel, jedoch fehlt ihnen im Vergleich dazu der Clathrinmantel. Im unteren Teil des Bildes sieht man eine glatte Muskelzelle im Längsschnitt. Ihr Zellkern (N) enthält viel Heterochromatin und die Kernporen (Kp) der Kernmembran sind eindeutig sichtbar; SB: 1µm



**Abb. 33: Interdigitationen der glatten Muskelzellen (Hautlokalisation: bovine Zitzenbasis)**



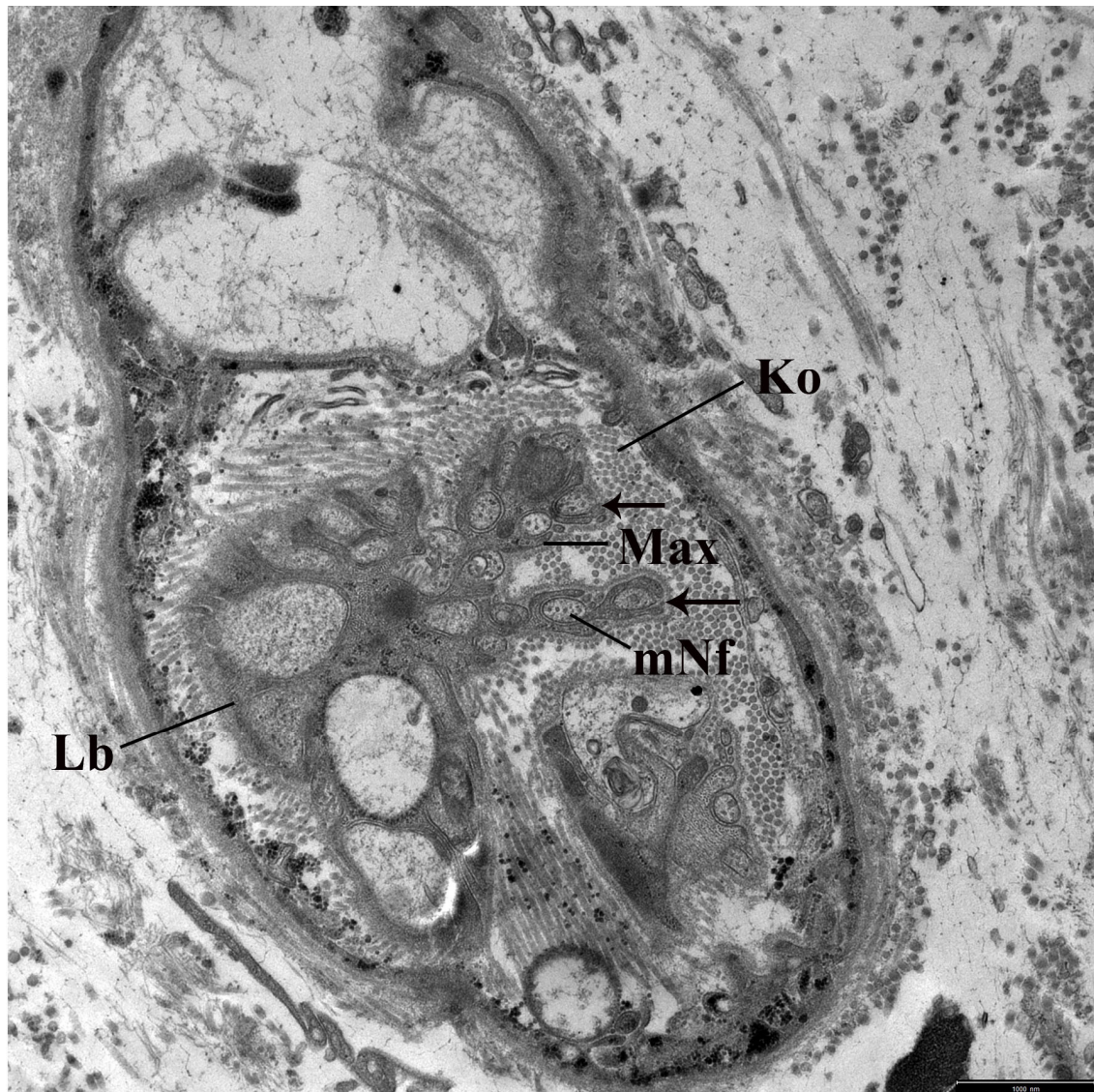
Hier sieht man die Verzahnung der glatten Muskelzellen untereinander mittels Interdigitationen (Pfeile). Am Zellkern (N) der unteren Zelle sind die Kernporen (Kp) und der Nucleolus (Nc) gut erkennbar. Beide Zellkerne (N) enthalten viel Heterochromatin (Hc). Es sind wenige Mitochondrien (Mi) im Zytoplasma vorhanden; SB: 0,5µm



### **4.2.3. Nerven**

In diesem Abschnitt möchte ich auf den in Abbildung 34 dargestellten marklosen Nerv eingehen.

Mittig im Nerv sieht man mehrere marklose Nervenfasern, die eine runde bis ovale Form besitzen. Sie werden von Einstülpungen der Zellmembran, sogenannten Mesaxonen, partiell begrenzt. An einer Stelle ist das Neurolemm offen und nicht vom Mesaxon umschlossen. Um die Nervenfasern herum lässt sich wenig Zytoplasma beobachten. Die übrigen Zellorganellen liegen etwas entfernt von den Nervenfasern in einem seitlichen Teil der Zelle, in dem auch mehr Zytoplasma vorhanden ist. Umgeschlossen wird die gesamte Nervenzelle von einer deutlich ausgeprägten Basalmembran. In direkter Umgebung der Zelle liegen zahlreiche Kollagenfasern und vereinzelt Fibrozyten.

**Abb. 34: Markloser Nerv in der bovinen Dermis (Hautlokalisation: Zitzenbasis)**

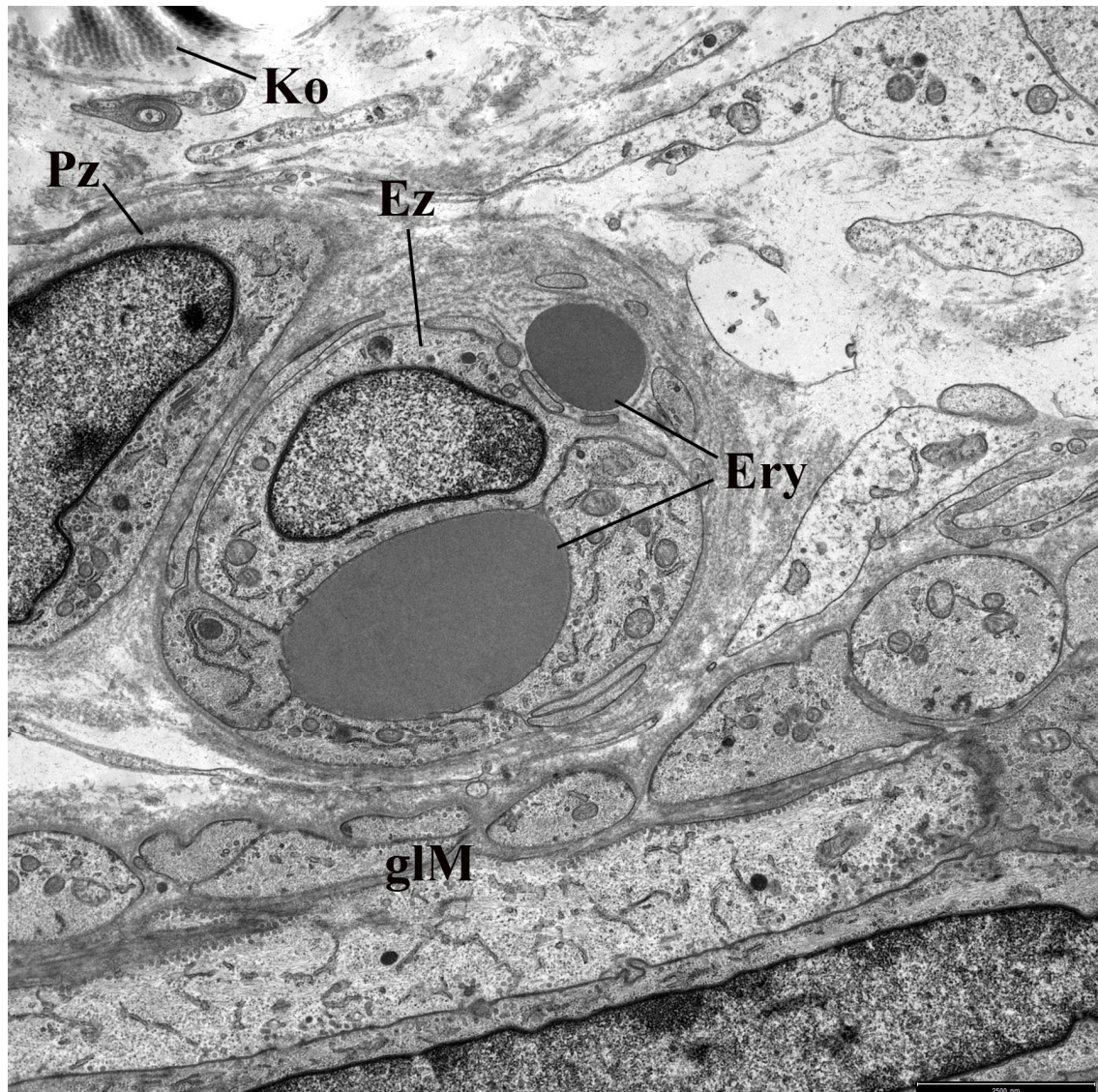
Dargestellt ist ein markloser Nerv im Bindegewebe. Gut sichtbar sind mehrere marklose Nervenfasern (mNf), die von einem Mesaxon (Max) ummantelt sind. An den Stellen an denen das Neurolemm unterbrochen ist (Pfeile) kann der Nerv erregt werden. Die Nervenfasern werden von der Lamina basalis (Lb) umschlossen. Die übrigen Zellorganellen des Nervs sind auf diesem Bild nicht eindeutig identifizierbar. In direkter Umgebung des Nervs liegen viele Kollagenfasern (Ko), die sowohl quer als auch längs angeschnitten sind; SB: 1µm

#### **4.2.4. Blutgefäße und Mastzellen**

In der Dermis der bovinen Euterhaut sind viele Blutgefäße, vor allem kleine Kapillaren vorhanden. Die Kapillaren besitzen ein schmales Lumen, welches vereinzelt Erythrozyten enthält (Abbildung 35). Die Endothelzelle der Kapillare ist normalerweise platt, stellt sich jedoch bei der ultrastrukturellen Untersuchung auf Grund des fehlenden Blutflusses breit dar. Der Zellkern hat eine länglich-ovale Form und besitzt mäßig viel Heterochromatin. Die Kapillare wird von einer mäßig elektronendichten Basalmembran umschlossen. Die Tunica media, die durch eine bis mehrere Schichten glatter Muskelzellen gebildet wird, ist in den kleinen Kapillaren nicht vorhanden. In der Adventitia des Blutgefäßes liegen kollagene Fasern und Fibrozyten sowie vereinzelt Perizyten. Die Perizyten sind meist größer als die Endothelzellen und besitzen einen großen Zellkern mit viel Heterochromatin, der den größten Teil der Zelle einnimmt.

In direkter Nähe zu den Blutgefäßen kann man Mastzellen mit einer länglichen Form beobachten (Abbildung 36). Diese gefäßnahen Mastzellen zählen zu den freien Bindegewebszellen, da sie sich aktiv bewegen können. In ihrem Zytoplasma sind zahlreiche elektronendichte Vesikel vorhanden, welche die Amine Heparin und Histamin enthalten. In einigen Proben sind vereinzelt perivaskulär freie Vesikel in der Dermis sichtbar, was auf eine Ausschleusung der Vesikel mit intakter Zellmembran aus der Mastzelle schließen lässt. Vereinzelt lassen sich im Zytoplasma Mitochondrien beobachten. Die übrigen Zellorganellen sind auf Grund der großen Anzahl an elektronendichten Vesikeln schlecht identifizierbar. Der Zellkern der Mastzellen hat eine längsovale Form und besitzt große Mengen an Heterochromatin, das sich vorwiegend kernmembranständig anhäuft.

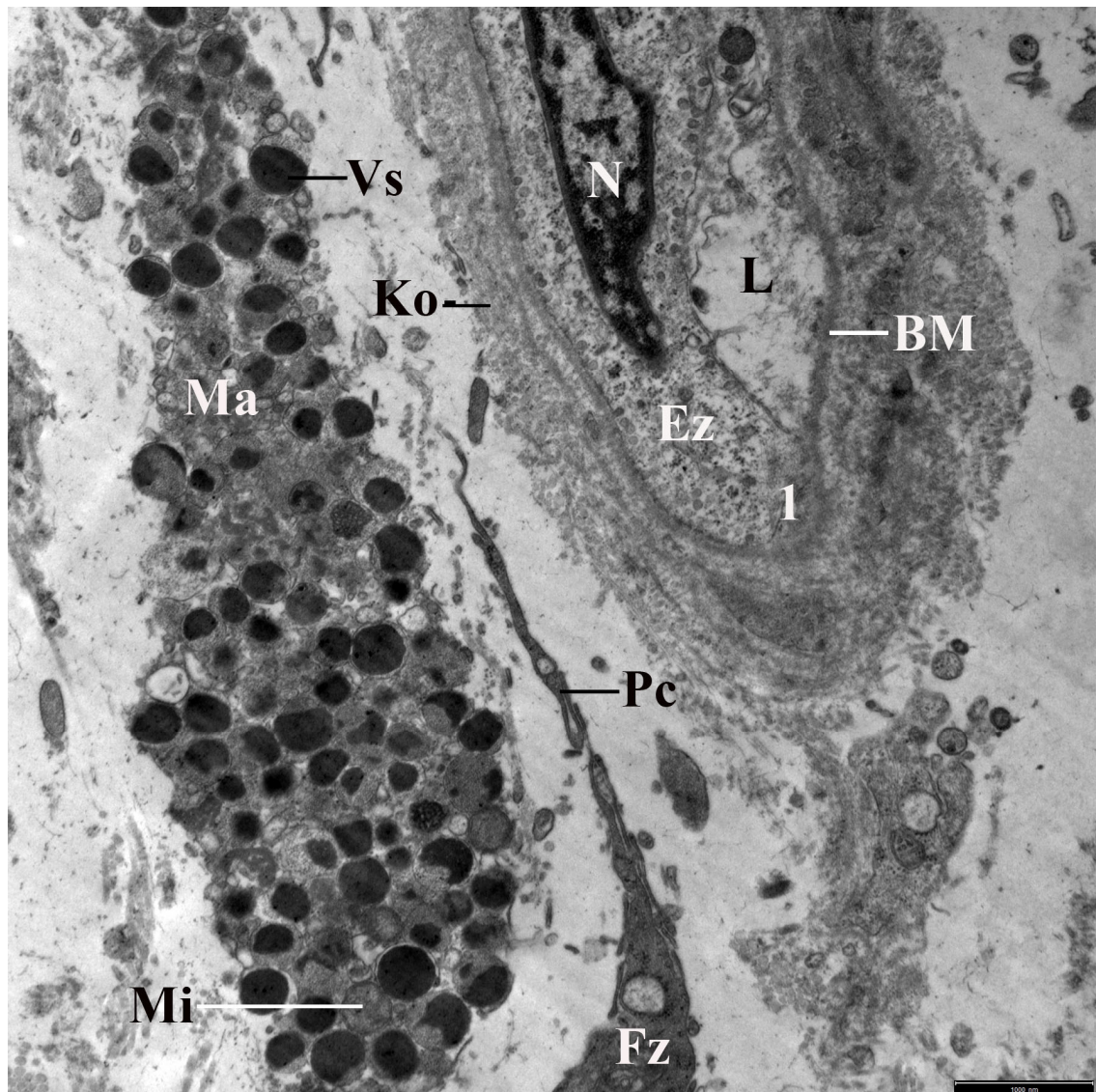


**Abb. 35: Kapillare in der bovinen Euterhaut (Hautlokalisation: Zitzenbasis)**

Darstellung einer kleinen Kapillare in der bovinen Dermis. Man sieht zwei Erythrozyten (Ery), von denen einer das komplette Lumen des Blutgefäßes ausfüllt. Neben der Endothelzelle (Ez) liegt ein Perizyt (Pz) mit einem großen heterochromatinreichen Zellkern. Unterhalb der Kapillare schließen sich glatte Muskelzellen (glM) an. Oben links sind mehrere kollagene Fasern (Ko) sichtbar; SB: 2,5µm



**Abb. 36: Kapillare und Mastzelle in der bovinen Dermis (Hautlokalisation: Zit-zenspitze)**



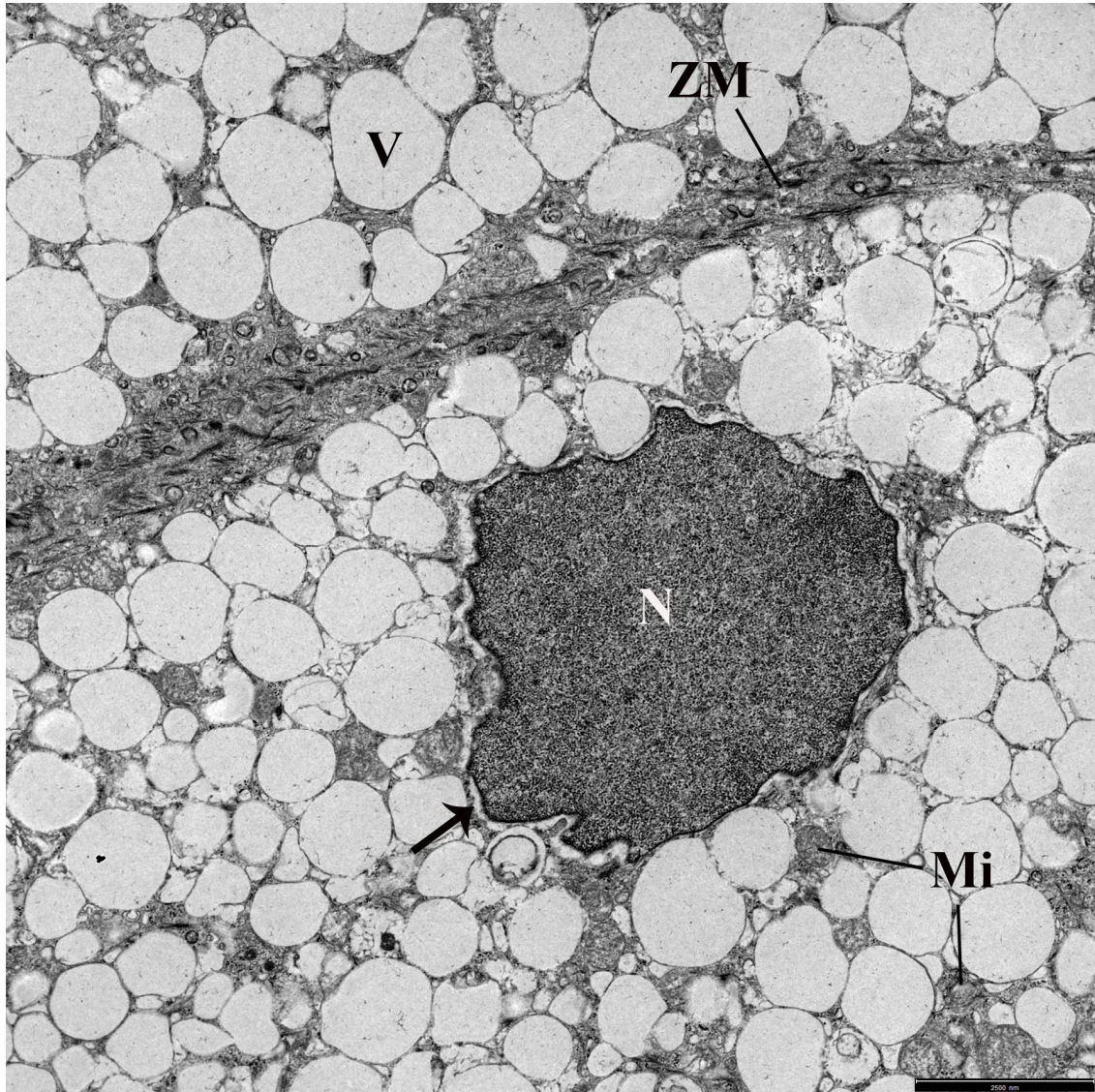
In diesem Bild sieht man eine Mastzelle (Ma) in direkter Nachbarschaft zu einem Blutgefäß (1). Der Zellkern der Mastzelle ist nicht sichtbar, aber einige Mitochondrien (Mi) und die typischen elektronendichten Sekretvesikel (Vs), die Histamin und Heparin enthalten. Die Kapillare (1) zeigt eine Endothelzelle (EZ) mit einem länglichen Zellkern (N), bei dem das Euchromatin mittig und das Heterochromatin membranständig liegt. Außen schließt sich eine gut abgrenzbare Basalmembran (BM) an, die von vielen kollagenen Fasern (Ko) umschlossen ist. Das Lumen (L) in der Mitte enthält wenig elektronendichtes Material. Perivaskulär sieht man einen Fibrozyten (Fz) mit seinem unbeweglichen Processus cellularis (Pc); SB: 1µm

#### **4.2.5. Talgdrüsen**

Die holokrinen Talgdrüsen sind in der gesamten Dermis der Euterhaut mit dem Vorkommen von Haaren assoziiert. Im äußeren Bereich einer Talgdrüse liegen die Basalzellen der Basalmembran auf. Sie besitzen einen ovalen Zellkern mit viel Heterochromatin. In ihrem Zytoplasma sind keine sekretgefüllten Vesikel vorhanden. Massenhaft leer erscheinende talggefüllte Vesikel unterschiedlicher Größe findet man in den sekretorisch aktiven Talgdrüsenzellen (Abbildung 37). Sie nehmen den größten Teil der Zellorganellen im Zytoplasma ein und erschweren die Beurteilung der übrigen Strukturen. Der Zellkern dieser Zellen ist meist rund mit einer leicht unregelmäßig geformten Oberfläche. Das Heterochromatin ist homogen verteilt und etwas weniger vorhanden als in den Basalzellen der Talgdrüse. Die Zellen sind über Desmosomen und kleine Interdigitationen miteinander verbunden.



**Abb. 37: Holokrine Talgdrüsenzelle der bovinen Dermis (Hautlokalisation: seitliche Euterhaut Hinterviertel)**



Dargestellt ist eine Talgdrüsenzelle aus dem mittleren Bereich einer Talgdrüse. Die vielen Talgdrüsensekret enthaltenden Vakuolen (V) erscheinen optisch leer und nehmen einen Großteil der Zelle ein. Es sind nur noch wenige andere Zellorganellen sichtbar, wie z. B. unten links einige Mitochondrien (Mi). Der elektronendichte Zellkern (N) besitzt eine unregelmäßige Oberfläche und eine homogene Verteilung von Eu- und Heterochromatin. Gut erkennbar ist der geteilte Aufbau der Kernmembran mit einer elektronendichten inneren Membran, einem breiten perinukleären Raum (Pfeil) und einer schwach elektronendichten äußeren Membran. Die Zellmembran (ZM) zwischen den zwei Talgdrüsenzellen besitzt einige Interdigitationen und Desmosomen; SB: 2,5µm



## V. DISKUSSION

In dieser Arbeit habe ich die Euterhaut der Kuh und der Färse (*Bos taurus*) licht- und elektronenmikroskopisch untersucht, um genauere Informationen zum histologischen Aufbau, vor allem im Bereich der Zitze, zu bekommen. Die histologische Charakterisierung der Euterhaut erfolgte mittels konventioneller Färbemethoden, Immunhisto- und Glykohistochemie sowie der Transmissionselektronenmikroskopie.

Ein Schwerpunkt meiner Untersuchungen war das Herausstellen der histomorphologischen Unterschiede im Aufbau der Euterhaut zwischen laktierenden und nicht-laktierenden Rindern. Zudem gibt es in der aktuellen Literatur noch keine Veröffentlichungen zur Ultrastruktur und zur Kohlenhydratzusammensetzung der bovinen Euterhaut.

Für meine Untersuchungen habe ich von jeweils fünf Kühen und fünf Färsen der Rasse Fleckvieh an fünf verschiedenen Euterlokalisationen Hautproben entnommen (Zitzenspitze, mediale Zitzenbasis, laterale Zitzenbasis (alle drei Proben von der linken hinteren Zitze), rechte laterale Euterhaut des Vorderviertels, linke laterale Euterhaut des Hinterviertels). Diese Lokalisationen habe ich für geeignet befunden, da die Zitze eine häufige Eintrittspforte für Krankheitserreger darstellt und weitere Untersuchungen der Zitzenhaut auf histomorphologischer Basis von Bedeutung sind. Dementsprechend habe ich meine Probennahme vorwiegend auf die Zitzenhaut konzentriert. Zudem haben LUDEWIG et al. (1996), die die Euterhaut an sieben definierten Stellen untersucht haben, nur Unterschiede zwischen der behaarten Haut und der unbehaarten Haut der Zitze feststellen können. Die zwei am seitlichen Euter entnommenen Proben dienen demnach lediglich als Vergleich und sind deshalb einmal links und einmal rechts entnommen worden. Die Auswahl der linken hinteren Zitze für die Probennahme ist rein zufällig erfolgt.

Die Euterhautproben wurden von Fleckvieh Rindern am Schlachthof München genommen und wiesen adspektorisch keinerlei Veränderungen auf. Zudem waren die Tiere gesund und BSE frei. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt gesondert nach den jeweiligen angewandten Untersuchungsmethoden.

## **1. Diskussion der histomorphologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen**

Histologisch-histochemische Untersuchungen an der bovinen Euterhaut wurden schon von LUDEWIG et al. (1996) durchgeführt. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass die Euterhaut einen von der Grundstruktur gleichen Aufbau im Vergleich zur äußeren Haut zeigt (MONTEIRO-RIVIERE, 1991; FRITSCH, 1998; HABERMEHL, 2005). Die Ergebnisse seiner Arbeit stimmen weitestgehend mit meinen überein, wobei kleinere Unterschiede aufgefallen sind, die in diesem Kapitel diskutiert werden. Zur Ultrastruktur der bovinen Euterhaut sind in der aktuellen Literatur noch keine Untersuchungen veröffentlicht. Dementsprechend ist ein Vergleich meiner Ergebnisse mit bekannten Parametern nur eingeschränkt möglich.

Das Stratum corneum, die äußerste Schicht der Epidermis, teilt sich in ein kompaktes Stratum conjunctum und ein abgelöstes lockeres Stratum disjunctum (LUDEWIG et al., 1996). Meine Untersuchungen dagegen haben ergeben, dass einige Proben keinerlei Abschlüfungen im Stratum corneum aufwiesen und somit ein zweischichtiger Aufbau nicht immer ersichtlich ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der unterschiedlichen Haltung oder in einer differierenden Melktechnik liegen.

Das Stratum granulosum ist aus ein bis drei Zelllagen aufgebaut und besitzt basophile Keratohyalin granula im Zytoplasma (LUDEWIG et al., 1996), die sich bei meinen ultrastrukturellen Untersuchungen als elektronendichte amorphe Substanz dargestellt hat. Ultrastrukturell auffallend sind in dieser Schicht die zytoplasmatischen Glykogeneinlagerungen, die im Stratum spinosum nicht vorhanden sind. EBACH (2011) beschreibt im Gegensatz dazu umfangreiche Glykogeneinlagerungen im Zytoplasma der Zellen des Stratum spinosum in der fetalen Rinderhaut, die mit zunehmendem Alter des Fetus langsam abnehmen. Dies könnte also eine Besonderheit des Alters- bzw. Entwicklungsstandes sein. Die Keratinozyten des Stratum granulosum sind über wenige Desmosomen miteinander und über viele Desmosomen mit den Zellen des Stratum spinosums verzahnt. Die Abnahme der Desmosomenanzahl in den apikalen Schichten könnte mit der fortschreitenden Keratinisierung zusammenhängen. Ein Stratum lucidum konnte ich in der bovinen Euterhaut nicht nachweisen. Dies bestätigt frühere Ergebnisse von LUDEWIG et

al. (1996).

Das Stratum spinosum zeigt in der ultrastrukturellen Untersuchung Zellen mit stark verbreiterten Interzellularräumen, Interdigitationen und Desmosomen. Gleiches wurde auch von EBACH (2011) in der fetalen Rinderhaut beobachtet. Zudem konnten vereinzelt antigenpräsentierende Zellen (Langerhans) festgestellt werden, wie sie auch typischerweise in der Epidermis der äußeren Haut des Menschen vorkommen (MONTEIRO-RIVIERE, 1991). Diese Zellen lassen sich durch ihr elektronenarmes Zytoplasma gut von den umgebenden Keratinozyten abgrenzen. Eine Aussage über die Anzahl der dendritischen Zellen in der Epidermis bedarf weiterer Untersuchungen. Im Rahmen meiner Untersuchungen konnte ich zahlreiche Tonofilamente im Zytoplasma der Keratinozyten dieser Schicht feststellen. Dies wird auch von einigen Autoren für die humane Epidermis und für die fetale Rinderhaut beschrieben (PAVELKA & ROTH, 2010; EBACH, 2011).

LUDEWIG et al. (1996) haben bei den drei von ihnen untersuchten Kühen der Rasse „Schwarzbunt“ im Stratum basale der Epidermis Melanineinlagerungen gefunden und eine Melanozytenaktivität beschrieben. Diese konnte ich in keiner meiner Proben beobachten. Der Grund hierfür ist vermutlich die rassenspezifische Pigmentierung der Haut bzw. eine überwiegend fehlende Pigmentierung der Euterhaut bei den von mir untersuchten Rindern der Rasse Fleckvieh.

In der Haut der Zitzen liegen viele sensible Nervenfasern und Mechanorezeptoren (WEYRAUCH & SMOLLICH, 1998). In der ultrastrukturellen Untersuchung haben sich vereinzelt Merkelzellen, die als Druckrezeptoren wirken, im Stratum basale dargestellt (MONTEIRO-RIVIERE, 1991). Nervenfasern ließen sich sowohl durch die immunhistologische Untersuchung mit GFAP-Antikörpern, als auch ultrastrukturell in der Dermis identifizieren. Die Innervation der Euterhaut variiert in den verschiedenen Bereichen des Euters und zeigt eine reiche Innervation in der Haut der Zitzenspitze (MICHEL, 1993).

Die Epidermisdicke der Euterhaut eines Tieres nimmt bei geringer werdender Behaarung zu (LUDEWIG et al., 1996). Durch meine vergleichende Untersuchung der Euterhaut von Kühen und Färsen konnte ich zudem feststellen, dass die Epidermisdicke vor allem an der Zitze variiert und bei laktierenden Kühen deutlich dicker ist (Epidermisdicke Kuhzitze: 350 - 370 µm; Epidermisdicke Färsenzitze: 300 – 330 µm). Dies ist vermutlich auf die erhöhte mechanische Beanspru-

chung der Zitzenhaut während der Laktation zurückzuführen. LUDEWIG et al. (1996) beschreiben für die Euterhaut eine Epidermisdicke von 60 – 200 µm bei Schwarzbunten Rindern. Die Schwankungen der Epidermisdicke bei Schwarzbunten und den von mir untersuchten Fleckvieh Rindern sind vermutlich rassespezifisch.

Die Behaarung ist durch einzeln liegende Haare charakterisiert und das Vorkommen zeigt regionale Schwankungen (LUDEWIG et al., 1996). Meine histomorphologischen Beobachtungen zum Aufbau der Haare der Euterhaut decken sich mit den Ergebnissen der adulten Rinderhaut von EBACH (2011).

Verschiedene Autoren haben bisher die apokrinen Schlauchdrüsen (Schweißdrüsen) der allgemeinen äußeren Haut des Rindes untersucht (GOLDSBERRY & CALHOUN, 1959; JENKINSON & NAY, 1972; GERISCH, 1977; MEYER et al., 1978). Im Bereich des Rindereuters stellen sie sich morphologisch ähnlich dar und sind zahlreich vorhanden (LUDEWIG et al., 1996). Die Schweißdrüsen kommen gemeinsam mit Haaren vor und liegen basal der Haarzwiebel (LUDEWIG et al., 1996). Dementsprechend konnten in der Haut der Zitzenspitze keine Schweißdrüsen beobachtet werden, da diese haarlos ist (MICHEL, 1994). Die Proben der medialen und lateralen Zitzenbasis wiesen wider Erwarten vereinzelt Haare und Schweißdrüsen auf, was vermutlich auf die Probennahme-Technik, bei der auch schon etwas Haut des seitlichen Euters mit entnommen wurde, zurückzuführen ist.

Die Schweißdrüsen sind unter anderem an der Produktion von Pheromonen beteiligt, die die Kommunikation zwischen Individuen steuern (WYATT, 2003; WYATT, 2009). Für mich hat sich die Frage gestellt, ob es einen histomorphologischen Unterschied in der Struktur der Schweißdrüsen von Kühen und Färsen gibt, der die vermutete pheromongesteuerte Interaktion eines neugeborenen Kalbes mit dem Euter des Muttertieres erklären könnte. Bei meinen Untersuchungen konnte ich keine histomorphologischen Unterschiede der Schweißdrüsen feststellen. Zur Klärung der oben genannten Fragestellung sind demnach weitere (evtl. biochemische und physiologische) Untersuchungen notwendig.

Die Talgdrüsenzellen der bovinen Rinderhaut zeigen in der ultrastrukturellen Untersuchung im gesamten Zytoplasma eine Ansammlung von Sekret-gefüllten Vesikeln. Die übrigen Zellorganellen sind kaum noch sichtbar (JENKINSON et

al., 1985). Die Beschreibungen der Ultrastruktur der Talgdrüsenzellen der äußeren Haut des Rindes von JENKINSON et al. (1985) treffen auch auf die Euterhaut zu. EBACH (2011) beschreibt einen dreilappigen Aufbau der Talgdrüsenanlagen in der fetalen Rinderhaut. Diesen konnte ich in meinen Untersuchungen nicht feststellen, was aber eventuell auf schnitttechnische Variationen zurückzuführen ist. In der äußeren Haut des Pferdes bestehen die Talgdrüsen aus zwei bis acht Lappen (TALUKDAR et al., 1972).

Der *Musculus arrector pili* der bovinen Euterhaut stellt sich ähnlich dar wie in der äußeren Haut. Er ist kräftig ausgebildet und liegt immer auf der Neigungsseite des Haares (LUDEWIG et al., 1996). LUDEWIG et al. (1996) beschreiben einen speziell die Haarzwiebel umfassenden Ansatz des *M. arrector pili* als Besonderheit der bovinen Euterhaut. Meine Untersuchungen haben ergeben, dass der *M. arrector pili* im unteren mittleren Abschnitt des Haarfollikels ansetzt. EBACH (2011) beschreibt dies ähnlich für die fetale Haut des Rindes. Die Ursache hierfür könnte zufällig oder rassespezifisch sein (Schwarzbunte Kuh vs. Fleckvieh). Bei der ultrastrukturellen Untersuchung der glatten Muskelzellen konnten zahlreiche alveoläre Caveolae festgestellt werden. Sie dienen als Kalziumionenspeicher der Muskelzellen (JASTROW, 1998).

Interessant sind die vielen freien Zellen, die im Papillarkörper, im subepidermalen Bindegewebe und in der dermalen Haarwurzelscheide der bovinen (Euter-)Haut zu beobachten sind (LUDEWIG et al., 1996; EBACH, 2011). Bei meinen Untersuchungen konnte ich zudem auch Ansammlungen von freien Zellen in direkter Nähe der Talgdrüsenanlagen und perivaskulär feststellen. Diese freien Zellen färben sich mit Alzianblau bei pH 2,5 (EBACH, 2011) und pH 1,0 an. Ein Anfärben dieser Zellen bei einem pH-Wert von 1,0 spricht für das Vorkommen von sulfatierten Mukosubstanzen (ROMEIS, 2010). Zur genauen Differenzierung und weiteren Kenntnissen der klinischen Relevanz dieser Zellen sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Einige Strukturen der bovinen Euterhaut (Schweißdrüsen, Haare, freie Zellen) sind im Ergebnissteil der ultrastrukturellen Untersuchung nicht vorhanden, da eine vollständige Darstellung aller Zellen und Strukturen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Umfangreiche Ergebnisse zur Ultrastruktur der Haare und Haaranlage der adulten und fetalen Rinderhaut finden sich in der Arbeit von EBACH (2011). Die Studie von JENKINSON et al. (1979) befasst sich mit der Ultrastruk-

tur der Schweißdrüsen des Rindes.

Durch die histomorphologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen konnte ich feststellen, dass die Euterhaut des Rindes in ihrem generellen Aufbau dem Bau der äußeren Haut entspricht. Des Weiteren gibt es, bis auf geringe Unterschiede in der Dicke der Epidermis, keine markanten Unterscheidungsmerkmale zwischen der Euterhaut von Färsen und Kühen.

## 2. Diskussion der immunhistochemischen Untersuchungen

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich durch immunhistochemische Färbungen mittels neun verschiedener Antikörper zell- und gewebespezifische Antigene (Proteine) der bovinen Euterhaut dargestellt. Bisher sind die genauen Funktionen einiger Proteine in der normalen Haut von Säugetieren noch nicht hinreichend geklärt (XU et al., 2008). Die Kenntnisse zum Vorkommen von speziellen Antigenen (z. B. Cyclooxygenase 2) in Zellen der Haut haben eine wichtige Bedeutung bei der Differenzierung und Therapie von epithelialen Hauttumoren und Entzündungen (ALTMAYER, 2013).

Ich habe in meiner Dissertation immunhistochemische Färbungen durchgeführt, da in der aktuellen Literatur keine Ergebnisse zur Antigenverteilung (Proteine) in der normalen bovinen Euterhaut zu finden sind und die Funktion einiger Zellproteine (z. B. COX-2) in der normalen Säugetierhaut noch nicht hinreichend geklärt ist. EBACH (2011) hat im Rahmen ihrer Disseration immunhistochemische Färbungen an der fetalen und adulten äußeren Haut des Rindes durchgeführt. Ergebnisse dieser Arbeit waren, dass Vimentin (Zytoskelettprotein von mesenchymalen Zellen, ALTMAYER (2013)) eine deutliche Expression in den Fibrozyten der dermalen Papille, der dermalen Haarwurzelscheide, den Endothelzellen der Blutgefäße, den Muskelzellen des Haarmuskels und dendritischen Zellen der adulten bovinen Haut zeigt. MORIOKA et al. (2011) beschreiben ebenfalls eine Expression von Vimentin in der dermalen Haarwurzelscheide und der dermalen Papille in der normalen Haut junger Ratten. Auf Grund dieser Lokalisation vermuten die Autoren das Vimentin eine Basiskomponente bei der Unterstützung der Haarfollikel darstellt. In der bovinen Euterhaut konnte ich Vimentin noch zusätzlich in den myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen nachweisen. In der dermalen Papille war allerdings kein Vimentin vorhanden.

Einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin konnte ich vorwiegend in glatten Muskelzellen (Tunica media der Blutgefäße, M. arrector pili, myoepitheliale Zellen der Schweißdrüsen, Muskelfasern der Dermis) sowie im suprabulbären Bereich der äußeren Haarwurzelscheide und der dermalen Haarwurzelscheide feststellen. Dies deckt sich weitestgehend mit den Ergebnissen, die EBACH (2011) an der adulten Rinderhaut festgestellt hat. Auf Grund ihrer Beobachtungen in der Rattenhaut vermuten MORIOKA et al. (2011), dass das  $\alpha$ -SMA in der dermalen



und äußeren Haarwurzelscheide eine verstärkende Funktion für die haarstützenden Strukturen besitzt.

Im Gegensatz zu  $\alpha$ -SMA stellt sich die dermale Haarwurzelscheide und die dermale Papille der Rattenhaut bei der Antikörperfärbung für Desmin negativ dar (JAHODA et al., 1991). Desmin ist ein Intermediärfilament-Protein, das im Zytoplasma der Skelettmuskelzellen, der glatten Muskelzellen und der Herzmuskelzellen vorliegt (ALTMAYER, 2013). In der Haut junger transgener Mäuse kommt Desmin in den basalen Schichten der Epidermis und der äußeren Haarwurzelscheide vor (KIRFEL et al., 2002). Bei meinen Untersuchungen an der bovinen Euterhaut konnte ich Desmin ebenfalls in der Epidermis und der äußeren Haarwurzelscheide nachweisen. Zusätzlich zeigte sich, wie schon zu erwarten, eine Expression in Muskelzellen (M. arrector pili, Muskelfaserbündel der Dermis, Tunica media der Blutgefäße und myoepitheliale Zellen der Schweißdrüsenendstücke). Desmin zählt zu den fünf Haupttypen der Intermediärfilamente (Cytokeratine, Desmine, Neurofilamente, Gliafilamente, Vimentin) in eukaryotischen Zellen, die zusammen mit Mikrotubuli und Actinfilamenten das Zytoskelett der Zelle bilden (ALTMAYER, 2013). Es spielt eine wichtige Rolle für die Architektur und Funktion der quergestreiften Muskelzellen (MILNER et al., 1996) und ist an der Positionierung der Mitochondrien und ihrer Respiration in der Muskelzelle beteiligt (MILNER et al., 2000). Wegen den wichtigen Funktionen die Desmin in der Zelle erfüllt, erschien es mir wichtig, die Histotopik der Expression auch in der bovinen Euterhaut zu untersuchen.

Als ein weiteres Intermediärfilament-Protein habe ich im Rahmen meiner Arbeit das Vorkommen von Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) untersucht. Dieses wird zur Identifizierung von Astrozyten und astrozytären Zellen verwendet (ALTMAYER, 2013). Auch DANIELYAN et al. (2007) haben verschiedene Untersuchungen auf GFAP-produzierende-Zellen in der Haut verschiedener Spezies durchgeführt. Genau wie in meinen Untersuchungen hat die Epidermis der jungen humanen Haut GFAP exprimiert, mit dem Unterschied, dass das Stratum corneum bei DANIELYAN et al. (2007) stark positiv und bei meinen Untersuchungen negativ war. Des Weiteren haben die Autoren bei ihren Untersuchungen eine Expression von GFAP in den Schweißdrüsen, den Blutgefäßen und den Haarfollikeln der humanen Haut festgestellt. Dies deckt sich mit meinen Beobachtungen an der Euterhaut. Zusätzlich konnte ich in dem von mir untersuchten Gewebe ein

Vorkommen von GFAP in den basalen Bereichen der Talgdrüsen und in einzeln liegenden Nervenfasern in der Dermis nachweisen. Über die genaue Funktion von GFAP-produzierenden-Zellen ist bisher wenig bekannt und für genauere Aufschlüsse bedarf es weiterer Untersuchungen (DANIELYAN et al., 2007).

Laminin, ein Basalmembran-Glykoprotein (ALTMAYER, 2013), ließ sich im bovinen Euterhautgewebe in den Basalmembranen aller epithelialer Hautstrukturen, sowie mit schwacher Expression in den Zellen des Haarbalgmuskels, der Epidermis und der äußeren Haarwurzelscheide nachweisen. EBACH (2011) beschreibt für das adulte bovine Hautgewebe ähnliche Ergebnisse. Diese zeigen jedoch keine Expression von Laminin in den Zellen der Epidermis.

Zur Darstellung der Verteilung der Kollagen-Typ-1-Fasern in der bovinen Euterhaut habe ich dieses Strukturprotein immunhistochemisch untersucht. Aufgefallen sind ein großes Vorkommen und eine diffuse Verteilung von Kollagen-1-Fasern in der gesamten Dermis. Zusätzlich konnte ich ein schwaches Vorkommen des Proteins im Bereich der Basalmembran der Epidermis nachweisen. Dies kann damit erklärt werden, dass die Kollagenfasern Typ 1 mit den Kollagenfasern Typ 4 der Basalmembran in Verbindung stehen.

Das Intermediärfilament-Protein Pancytokeratin ließ sich in allen epithelialen Geweben stark nachweisen. Interessant ist die sehr schwache Expression von Pancytokeratin im Stratum corneum der Epidermis.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich das Vorkommen und die Verteilung der Prostaglandin synthetisierenden Enzyme COX-1 und COX-2 in der bovinen Euterhaut durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Diese zwei Enzyme sind bei der Biosynthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure von großer Bedeutung. COX-2 ist im speziellen ein induzierbares Enzym, welches für die Prostaglandinsynthese an Entzündungsstellen verantwortlich ist (ALTMAYER, 2013). Zudem ist es zahlreich in einer Vielzahl von epithelialen Tumoren und physiologischer Weise in den suprabasalen Keratinozyten der humanen Epidermis vorhanden (NEUFANG et al., 2001). XU et al. (2008) haben verschiedene Untersuchungen an der Haut gesunder Ratten durchgeführt, um genaueres über die Funktion von COX-2 in der normalen Säugetierhaut herauszufinden. Dabei haben sie festgestellt, dass das Enzym in den Haarfollikeln, der Epidermis und den Talgdrüsen der normalen Rattenhaut vorkommt. Sie haben die Hypothese aufgestellt,

dass COX-2 auch an den physiologischen Mechanismen dieser Strukturen (z. B. Lipidproduktion der Talgdrüsen, Differenzierung der Epidermis, Morphogenese der Haarfollikel, Transformationen im Haarzyklus) beteiligt ist. Bei meinen Untersuchungen konnte ich COX-2 ebenfalls in der Epidermis, den Talgdrüsen und den Haaren (innere und äußere Haarwurzelscheide, Haarzwiebel) der Euterhaut nachweisen. Zusätzlich war ein Vorkommen in den Schweißdrüsen (basal), den Muskelfasern (auch *M. arrector pili*) und den Blutgefäßen vorhanden. Auf Grund des ubiquitären Vorkommens von COX-2 in der bovinen Euterhaut ist es sicherlich erforderlich weitere Untersuchungen durchzuführen, um eine Aussage über die genaue Funktion dieses Enzymes in der normalen Haut treffen zu können.

Meine Untersuchungen haben ergeben, dass das Enzym COX-1 in ähnlichen Strukturen und Zellen nachweisbar ist wie COX-2. Auffällig ist das Vorkommen von COX-1 in den Fibrozyten des Stratum papillare und reticulare, in denen COX-2 nicht vorhanden ist.

Durch meine immunhistochemischen Untersuchungen konnte ich einen guten Überblick über die Verteilungsmuster verschiedener wichtiger Zell- und Strukturproteine in der bovinen Euterhaut gewinnen. Bisher sind in der Literatur keine Ergebnisse zu immunhistochemischen Untersuchungen an der Euterhaut des Rindes veröffentlicht worden. Bekannte Parameter über die Verteilung und Funktion der Zellproteine der Haut stammen zumeist aus Untersuchungen an humanem oder murinem Gewebe. Um die genaue Funktion der einzelnen Proteine an den physiologischen Vorgängen der bovinen Euterhaut zu bestimmen, sind eingehende weitere biochemische und physiologische Untersuchungen erforderlich.

### 3. Diskussion der glykohistochemischen Untersuchungen

Glykokonjugate der Zellobermembranen vermitteln wichtige Prozesse, wie zelluläre Erkennung, Entwicklung und Differenzierung, Metastasierung, Zell-Zell-Erkennung und Zelladhäsion. Änderungen im Verteilungsmuster der Zelloberflächen-Glykokonjugate können bei entzündlichen, pre- und neoplastischen und immunmedierten Hautveränderungen durch Lektinbindung identifiziert werden (OOKUSA et al., 1983; FRANZ, 1990; GABIUS & GABIUS, 1997; SHARON & LIS, 2004; GABIUS, 2009). Zum Beispiel beschreiben LOUIS et al. (1981) in ihrer Studie die Änderung der Lektinbindung (und damit des Glykosylierungsmusters) an der normalen, der hyperplastischen und der neoplastischen humanen Epidermis. Die Autoren beschreiben eine starke Bindung des Lektins ConA an alle malignen Tumoren der Haut im Gegensatz zu keiner oder nur sehr schwacher Bindung im normalen und hyperplastischen Gewebe. Im Gegensatz dazu kann bei benignen Papillomen der Haut bei verschiedenen Tierspezies kein Unterschied in der Lektinbindung im Vergleich zur normalen Haut nachgewiesen werden (WHITELEY & SUNDBERG, 1988).

Um Kenntnisse zur Glykokonjugatverteilung in der normalen bovinen Euterhaut zu erlangen habe ich in dieser Arbeit Untersuchungen mit 16 Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Lektinen durchgeführt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Zur Überprüfung des Vorkommens von  $\alpha$ -Mannose- und Glukoseresten im bovinen Euterhautgewebe wurden die pflanzlichen Lektine PSA, ConA und LCA verwendet.

Mithilfe von PSA konnte Mannose in Teilen der Epidermis (Stratum spinosum und Stratum basale), in den Schweiß- und Talgdrüsen, in der inneren, äußeren und dermalen Haarwurzelscheide und der dermalen Papille der äußeren Haut des adulten Rindes nachgewiesen werden (EBACH, 2011). In der Euterhaut des Rindes zeigte sich Mannose vorwiegend im Sekret der Schweißdrüsen, einzelnen Fibrozyten in der Dermis, im Gefäßendothel der Blutgefäße und teilweise sehr deutlich im Stratum corneum der Epidermis. Die übrigen Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von EBACH (2011). ConA zeigt positive Reaktionen in der Dermis, der Basallamina und dem oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum der Epidermis der gesunden humanen Haut (HOLT et al., 1979; SCHAUMBURG-LEVER, 1990). Zusätzlich kann eine Bindung im Gefäß-

Endothel der Blutgefäße sowie im Stratum basale und Stratum corneum der Epidermis in der Haut verschiedener Tierspezies nachgewiesen werden (WHITELEY & SUNDBERG, 1988). Des Weiteren lässt sich eine Bindung von ConA an die Talgdrüsen und alle epithelialen Zellen der gesunden humanen Haut beobachten (VON KUSTER et al., 1986). Die Ergebnisse meiner Untersuchungen decken sich weitestgehend mit denen von HOLT et al. (1979), SCHAUMBURG-LEVER (1990), WHITELEY & SUNDBERG (1988) und VON KUSTER et al. (1986). Zusätzlich ließen sich, genau wie in anderen Bereichen der äußeren Haut des Rindes (EBACH, 2011), Mannose- und Glukosereste in der inneren und äußeren Haarwurzelscheide und den Schweißdrüsen der bovinen Euterhaut nachweisen.

Das pflanzliche Lektin RCA weist in der gesunden humanen Haut Galaktose in den ekkrinen Schweißdrüsen nach (OOKUSA et al., 1983). In der Haut des Rindes gibt es keine ekkrinen, sondern nur apokrine Schweißdrüsen (LUDEWIG et al., 1996). Ein unterschiedlicher Aufbau in der Kohlenhydratzusammensetzung der menschlichen ekkrinen und bovinen apokrinen Schweißdrüsen könnte der Grund für meine negative RCA-Bindung in der Euterhaut sein. Auch EBACH (2011) konnte kein Galaktose in den apokrinen Schweißdrüsen durch RCA in der äußeren Haut des Rindes nachweisen. HOLT et al. (1979) beschreibt ein ähnliches Verteilungsmuster der Bindung von RCA und ConA in der normalen humanen Haut. Dieses Ergebnis kann ich durch meine Untersuchungen nur eingeschränkt bestätigen. Die Untersuchungen der Bindung von RCA an die äußere Haut des adulten Rindes ergaben eine starke Expression in der Epidermis, eine mittlere Expression in den Talgdrüsen und eine schwache Expression in den Haarfollikeln (EBACH, 2011). Ich konnte in meinen Untersuchungen keine Bindung von RCA in der Epidermis feststellen.

Als weitere Lektine zum Nachweis von Galaktose habe ich GSL-1 und PNA eingesetzt. GSL-1 bindet in den Zellen des Stratum basale und des unteren Stratum spinosum der normalen caninen Epidermis (CASTAGNARO & CANESE, 1991). In der äußeren Haut des adulten Rindes kann nur eine Bindung in den Talg- und Schweißdrüsen beobachtet werden (EBACH, 2011). Das bovine Euterhautgewebe zeigt eine positive Bindung in der Epidermis, der Basalmembran, dem Endothel der Blutgefäße, den Schweißdrüsen und teilweise der inneren Haarwurzelscheide. Eine positive Reaktion der Talgdrüsen, wie für die äußere Haut des Rindes beschrieben, ist nicht vorhanden.

Das Galaktose-bindende Lektin PNA färbt in der adulten Haut des Rindes lediglich Teile der Epidermis und den Haarkanal (EBACH, 2011). In der Haut des Menschen lässt sich eine Bindung an Schweiß- und Talgdrüsen sowie die innere und äußere Haarwurzelscheide beobachten (TSUBURA et al., 1992). Des Weiteren beschreiben OOKUSA et al. (1983) und SCHAUMBURG-LEVER (1990) in ihren Arbeiten eine Bindung von PNA an die Zellmembranen der Keratinozyten des Stratum spinosum und granulosum der Epidermis. Zusätzlich zu diesen zwei Zellschichten konnten WHITELEY & SUNDBERG (1988) Galaktose durch PNA im Stratum corneum verschiedener Tierspezies (Pferd, Hund, Rind, Maultier- und Weißwedelhirsch) nachweisen. In der bovinen Euterhaut zeigte PNA eine relativ schwache Bindung an die Zellmembranen der Keratinozyten der Epidermis, die Talgdrüsen und die innere Haarwurzelscheide.

Zum Nachweis der N-Acetyl-D-Galaktosamin/D-Galaktosamin-Vorkommen in der bovinen Euterhaut habe ich Untersuchungen mit den Lektinen SBA, SJA, SNA und DBA durchgeführt.

DBA zeigte fast keine Bindung an das Gewebe der bovinen Euterhaut. In der äußeren Haut des adulten Rindes kann lediglich eine mittelstarke Bindung an den Zelloberflächen der Haarkutikula festgestellt werden (EBACH, 2011). Im Gegensatz dazu ist von verschiedenen Autoren eine positive Bindung von DBA in den Keratinozyten, den Schweiß- und Talgdrüsen und der inneren Haarwurzelscheide der normalen humanen Haut beschrieben (OOKUSA et al., 1983; SCHAUMBURG-LEVER, 1990; TSUBURA et al., 1992).

EBACH (2011) beschreibt für die äußere Haut des Rindes eine starke Expression von SBA in den Schweißdrüsen. Bei der bovinen Euterhaut konnte ich lediglich eine schwache Bindung an die Schweißdrüsen feststellen. Eine unterschiedliche Lektinkonzentration könnte die Ursache hierfür sein, da EBACH (2011) bei ihren Untersuchungen eine Lektinkonzentration von 10µg/ml und ich eine Konzentration von 5µg/ml verwendet habe.

Deutlich positive Ergebnisse lieferte die Untersuchung auf das Vorkommen von N-Acetyl-D-Glucosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure in der bovinen Euterhaut mithilfe der Lektine WGA und s-WGA.

Ähnlich wie EBACH (2011) an der äußeren Haut des Rindes herausgefunden hat, bindet WGA in sehr starkem Maße an die Schweißdrüsen der Euterhaut. Zusätz-



lich zu den Ergebnissen, die die Autorin in ihrer Dissertation beschreibt, konnte ich bei meinen Untersuchungen noch eine Bindung des Lektins an die Zellmembranen von Muskelzellen in der Dermis beobachten. Die Bindung von WGA an die Zellmembranen und Interzellularräume aller Zellen der Epidermis konnten WHITELEY & SUNDBERG (1988) bei verschiedenen Tierspezies nachweisen. Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen, mit dem kleinen Unterschied, dass sich die Zellmembranen des Stratum basale am stärksten angefärbt haben.

Bei verschiedenen Spezies (Pferd, Hund, Rind, Maultier- und Weißwedelhirsch) beschreiben WHITELEY & SUNDBERG (1988) eine Bindung von s-WGA an die Epidermis und eine fehlende Bindung an die Strukturen der Dermis. Dies stimmt nicht mit den Ergebnissen überein, die EBACH (2011) an der äußeren Haut des Rindes und ich im Rahmen meiner Untersuchungen an der bovinen Euterhaut erhoben haben. Bei meinen Untersuchungen der Bindung von s-WGA zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei WGA.

Zur Charakterisierung des Oligosaccharid-Verteilungsmusters im bovinen Euterhautgewebe habe ich die Lektine PHA-L, PHA-E und MAA-1 eingesetzt. MAA-1 zeigte nur wenige Bindungsstellen im Hautgewebe des Euters. Es bindet vorwiegend im Gefäßendothel der Blutgefäße, in den Talgdrüsen und in der inneren Haarwurzelscheide. EBACH (2011) beschreibt für die äußere Haut des adulten Rindes ebenfalls eine Bindung im Blutgefäßendothel und in den Talgdrüsen. Abweichend von meinen Ergebnissen konnte EBACH (2011) Oligosaccharide in den Schweißdrüsen nachweisen, wobei die innere Haarwurzelscheide negativ ist.

Die Lektine PHA-E und PHA-L zeigten eine Bindung an viele Strukturen der bovinen Euterhaut. Im Gegensatz dazu beschreibt EBACH (2011) für die äußere Haut des adulten Rindes nur eine Bindung von PHA-E an wenige Strukturen/Zellen (Stratum basale, Schweißdrüsen, dermale Papille, dermale Haarwurzelscheide und Gefäßendothel der Blutgefäße).

Die Ergebnisse meiner glykohistochemischen Untersuchungen an bovinem Euterhautgewebe ergänzen die in der aktuellen Literatur bisher bekannten Informationen zur Kohlenhydratstruktur der Haut. Bisher gibt es erst sehr wenige Studien an der Haut der Haussäugetiere. Als weiterführende Untersuchung wäre der Vergleich pathologisch (Inflammation, Neoplasie) veränderter zu normaler Euterhaut mittels Lektinhistochemie interessant.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Euterhaut des Rindes schützt die Milchdrüse vor externen Einflüssen und dient als erste Barriere der Abwehr von Infektionserregern. Zudem spielen die Mechanorezeptoren der Zitzenhaut eine wichtige Rolle beim Milchausschüttungsreflex. Das Rindereuter wird in der Pharmakologie und Toxikologie als Bovine-Udder-Skin-Modell (BUS-Modell) zur Testung der perkutanen Absorption verschiedener Stoffe und Chemikalien verwendet und die Ergebnisse liefern wertvolle Hinweise für den Schutz der menschlichen Haut.

Während die Haut des Menschen und vieler Tiere gut untersucht ist, gibt es in der aktuellen Literatur bisher erst eine histologische und histochemische Untersuchung zur Morphologie des Euterhautgewebes des Rindes und noch keine Erkenntnisse zur Ultrastruktur und zur Glykokonjugat- und Zellproteinverteilung.

Um weitere Kenntnisse zum Aufbau und zur Zusammensetzung der bovinen Euterhaut zu erlangen und die bestehenden Lücken in der Literatur zu schließen, wurden in dieser Arbeit verschiedene konventionelle histologische Färbungen, immunhistochemische und glykohistochemische Techniken und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden von zehn weiblichen Rindern der Rasse Fleckvieh an jeweils fünf Euter-Lokalisationen (Zitzenspitze, Zitzenbasis medial und lateral, seitliche Euterhaut des Vorderviertels, seitliche Euterhaut des Hinterviertels) Hautproben entnommen. Fünf der Tiere waren im Laktationsstadium und fünf Tiere wiesen ein juveniles Euter ohne Laktation auf. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Überprüfung histomorphologischer Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen.

Generelle Erkenntnisse zum Bau der Euterhaut konnten durch die Standardfärbung mit Hämalaun-Eosin gewonnen werden. Weiterhin wurde die Resorcin-Fuchsin-van-Gieson-Färbung, die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner, die Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) und die Alzianblau-Färbung bei pH 1,0 und pH 2,5 angewendet.

Die Euterhaut des Rindes entspricht in ihrem Aufbau weitgehend dem der äußeren Haut. Die Epidermis besitzt einen 4-schichtigen Aufbau aus Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Die Dicke variiert zwischen den Hautlokalisationen und den Tiergruppen. Im Bereich der Zitzenspitze

ist sie am größten. Die Epidermis der Färsen ist im Durchschnitt dünner als die der Kühe. Im Stratum granulosum lassen sich ultrastrukturell Keratohyalingranula und Glykogenansammlungen nachweisen. Die Keratinozyten der gesamten Epidermis sind über Desmosomen und Interdigitationen miteinander verbunden. Im Stratum spinosum ließen sich vereinzelt dendritische Zellen (Langerhans) beobachten. Zwischen den Basalzellen der Epidermis liegen einzelne Merkelzellen. Melanozyten ließen sich in keiner Probe nachweisen.

Die Haut der Zitzenspitze und inneren Zitzenbasis ist haar- und drüsenlos. Die Dermis der seitlichen Euterhaut des Vorder- und Hinterviertels besitzt unterschiedlich viele einzeln liegende Haare, mehrlappige Talgdrüsen und zahlreiche Schweißdrüsen mit großlumigen Endstücken. Bis auf geringe Differenzen in der Epidermisdicke ließen sich zwischen der Euterhaut von Kühen und Färsen keine histomorphologischen Unterschiede feststellen.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen auf spezifische Antigene in der Euterhaut wurden Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA, Vimentin, GFAP, Desmin, Pancytokeratin, Kollagen-1, Laminin, COX-1 und COX-2 verwendet. Dadurch konnte unter anderem das Zytoskelett der Keratinozyten genauer charakterisiert werden. Des Weiteren zeigte sich mit dem Astrozyten-Marker-Antikörper gegen GFAP ein deutliches Vorkommen GFAP-produzierender Zellen vor allem in der Epidermis. Genaue Informationen zu ihrer Funktion sind noch nicht bekannt und hier bedarf es weiterer Untersuchungen. Cyclooxygenase-2 ist ein induzierbares Enzym, welches eine wichtige Rolle bei der Prostaglandinsynthese an Entzündungsstellen spielt. Es ließ sich in vielen Zellen und Strukturen der Euterhaut nachweisen und weitere Untersuchungen müssen ihre Funktionalität aufweisen.

Anhand glykohistochemischer Methoden wurden die Zuckerstrukturen der Zellen des bovinen Euterhautgewebes charakterisiert. Hierfür wurden die pflanzlichen Glucose- und Mannose-bindenden Lektine PSA, ConA, LCA, die D-Galaktose-bindenden Lektine RCA, GSL-1, PNA, die N-Acetyl-D-Galaktosamin/D-Galaktosamin-bindenden Lektine SBA, SJA, SNA, DBA, die N-Acetyl-D-Glucosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure-bindenden Lektine WGA, s-WGA, das L-Fucose-bindende Lektin UEA-1 und die Oligosaccharid-bindenden Lektine PHA-L, PHA-E, MAA-1 auf ihr Bindungsverhalten an Zellen der Euterhaut untersucht. Mit hoher Affinität haben die Lektine WGA, s-WGA, ConA, GSL-1, PHA-E, PHA-L und PSA gebunden. Dies spricht für das Vorhandensein von Glucose- und

Mannoseresten, D-Galaktose, N-Acetyl-D-Glucosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure und Oligosacchariden. Die untersuchten Lektine zeigten überwiegend eine interzelluläre Bindung an Zelloberflächen, jedoch auch teilweise eine intrazelluläre Bindung. Keinerlei Bindung konnte beim Lektin DBA beobachtet werden.

## VII. SUMMARY

### **Histological, histochemical and ultrastructural investigations of the bovine udder skin**

The bovine udder skin is a protective organ of the bovine mammary gland and is the first barrier against infectious agents. Additionally mechanoreceptors in the skin of the teat play an important role for the milk ejection reflex. In pharmacology and toxicology the bovine udder is used as an in vitro model (bovine-udder-skin-model (BUS)) for testing of percutaneous absorption of various substances and chemicals to get important information about skin protection in humans.

Whereas the skin of humans and many animals has been well studied, only one histological and histochemical study about the morphology of the bovine udder skin exists in current literature. Additionally, no knowledge about the ultrastructure, the glycoconjugate pattern or the distribution of important cellular antigens, such as the antigens of the cytoskeleton, is available.

The aim of my thesis was to gather information on the functional morphology of the skin covering the bovine udder using histological, histochemical and ultrastructural studies. Samples were taken from ten cows and heifers, from five different areas of the udder (tip of the teat, medial basis of the teat, lateral basis of the teat, lateral skin of the udder forequarter, lateral skin of the udder hindquarter). Five of the animals were lactating and five were heifers with no lactation.

The histology of the bovine udder skin was examined using several conventional staining methods (Haematoxylin-& Eosin-staining (H.E); Resorcin-Fuchsin-van-Gieson-staining; Goldner-staining; Alcian-blue-staining at pH 1,0 and 2,5 and PAS-reaction).

The histology of bovine udder skin is found very similar to other areas of the integument commune. The epidermis consists of 4 distinct layers: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum and stratum corneum. Thickness of the epidermis varies between the different regions of the udder and also between cows and heifers. The thickest epidermis was found on the tip of the teat. Furthermore, the epidermis of heifers is generally thinner compared to the epidermis of cows. Ultrastructural investigation showed medium amounts of glycogen and keratohya-



lin in the stratum granulosum. Epidermal keratinocytes are connected by extended desmosomes and intercellular interdigitations. Scattered dendritic cells (Langerhans` cells) can be found in the stratum spinosum and show a characteristic ultrastructure. In the basal layer of the epidermis single Merkel cells could be recognized. Melanocytes were not identified in any of the ultrathin sections.

Glands and hair follicles are missing in the skin of the internal teat basis and the tip of the teat, whereas the skin of the lateral udder quarters shows scattered hairs, multilobular sebaceous glands and numerous sweat glands with wide lumina.

For immunohistochemistry examinations, antibodies against  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), vimentin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), desmin, pancytokeratin, collagen-1, laminin, cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were used. Distinct GFAP was found in the epidermis and could be detected with an astrocyte-marking antibody against GFAP. The prostaglandin synthesizing enzyme COX-2 was found in many cells of the epidermis and skin of the bovine udder.

Using glycohistochemical methods the carbohydrate structures of the bovine udder skin were more closely characterized. The binding pattern of FITC labeled lectins (*Pisum sativum* agglutinin (PSA), *Canavalia ensiformis* agglutinin (ConA) and *Lens culinaris* agglutinin (LCA) which are specific for glucose and mannose, *Ricinus communis* agglutinin (RCA), *Griffonia simplicifolia* lectin-1 (GSL-1) and Peanut agglutinin (PNA) which attach to galactose, Soybean agglutinin (SBA), *Sophora japonica* agglutinin (SJA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) and *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) which bind to N-Acetyl-D-galactosamine, Wheat germ agglutinin (WGA) and succinyl-Wheat germ agglutinin (s-WGA) which detect N-Acetyl-glucosamine and N-Acetyl neuraminic acid, *Ulex europeus* agglutinin-1 (UEA-1) which binds to L-Fucose and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L), *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E) and *Maackia amurensis* leucoagglutinin-1 (MAA-1) which attach to oligosaccharide) in tissue sections from the skin of the bovine udder was studied. The lectins WGA, s-WGA, ConA, GSL-1, PHA-E, PHA-L and PSA showed a binding with high affinity to different skin structures, like epidermis, sweat glands, sebaceous glands and hairs. No binding to any cells of the bovine udder skin was observed with DBA.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

**Altmeyer, P.** Enzyklopädie der Dermatologie,

Allergologie, Umweltmedizin; Immunhistologie. Abgerufen am: 13.08.13. URL:  
[http://132.187.10.79/login/n/h/15416\\_1.htm](http://132.187.10.79/login/n/h/15416_1.htm). 2013.

**Aminoff, D, Morgan, WT, Watkins, WM.** The isolation and properties of the human blood-group a substance. *Biochem J* 1950; 46: 426-38.

**Blass, EM.** Reproductive biology: mammary messages. *Nature* 2003; 424: 25-6.

**Boyd, WC, Shapleigh, E.** Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 1954; 119: 419.

**Brennan, PA, Zufall, F.** Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 2006; 444: 308-15.

**Butenandt, A, Beckmann, R, Stamm, D, Hecker, E.** Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforsch. B.* 1959; 14: 283-4.

**Castagnaro, M, Canese, MG.** Lectin histochemistry on squamous metaplasia in different epithelial tumors of dogs. *Vet Pathol* 1991; 28: 8-15.

**Danielyan, L, Tolstonog, G, Traub, P, Salvetter, J, Gleiter, CH, Reisig, D, Gebhardt, R, Buniatian, GH.** Colocalization of glial fibrillary acidic protein, metallothionein, and MHC II in human, rat, NOD/SCID, and nude mouse skin keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 555-63.

**Ebach, K.** Diss. Uni München: Histologische, histochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen an der fetalen Haut des Rindes. München. 2011.

**Franz, H.** 100 years of lectin research--a balance. *Naturwissenschaften* 1990; 77: 103-9.

**Fritsch, P.** *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas*: Springer 1998.

**Gabius, H.** *The sugar code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim: Wiley-VCH. 2009.

**Gabius, HJ.** Glycobiomarkers by glycoproteomics and glycan profiling (glycomics): emergence of functionality. *Biochem Soc Trans* 2011a; 39: 399-405.

**Gabius, HJ, Andre, S, Jimenez-Barbero, J, Romero, A, Solis, D.** From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci* 2011b; 36: 298-313.

**Gabius, HJ, Gabius, S.** Detection of tumor-associated expression of carbohydrate-binding proteins (lectins). The use of neoglycoproteins and neoglycoenzymes in glycohistochemical and glycocytological studies. *Methods Mol Biol* 1993; 14: 263-75.

**Gabius, HJ, Gabius, S, Eds.** (1997). *Glycosciences*. Weinheim, Germany, Chapman&Hall.

**Gerisch, M-L.** Diss. Uni Hannover: Morphologie und Funktion der schlauchförmigen Drüsen in der behaarten Haut des Rindes unter Berücksichtigung ihrer Bedeutung für die Thermoregulation. Hannover. 1977.

**Goldsberry, S, Calhoun, ML.** The comparative histology of the skin of Hereford and Aberdeen angus cattle. *Am J Vet Res* 1959; 20: 61-8.

**Goldstein, I.** What should be called a lectin? *Nature* 1980; 285.

**Goldstein, I, Poretz, R.** Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine (Liener IE, SN, Goldstein IJ, ed.). Orlando: Academic Press 1986: 33-243.

**Habermehl, K.** Haut und Hautorgane. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane (Nickel R, SA, Seiferle E, ed.). Stuttgart: Parey Verlag. Bd. 3 2005: 443-576.

**Holt, PJ, Anglin, JH, Jr., Nordquist, RE.** Localization of specific carbohydrate configurations in human skin using fluorescein-labelled lectins. Br J Dermatol 1979; 100: 237-45.

**Hospes, R, Seeh, C.** Embryonale Entwicklung, Nomenklatur und Anatomie der Zitze. In: Sonographie und Endoskopie an der Zitze des Rindes 1999: 9- 12.

**Hudson, R.** Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior? Dev Psychobiol 1985; 18: 575-85.

**Jahoda, CA, Reynolds, AJ, Chaponnier, C, Forester, JC, Gabbiani, G.** Smooth muscle alpha-actin is a marker for hair follicle dermis in vivo and in vitro. J Cell Sci 1991; 99 ( Pt 3): 627-36.

**Jastrow, H.** Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet. Miniaturbildübersicht Haut (Integumentum commune). Abgerufen am: 08.08.2013. URL: <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMHaut.html>. 1998.

**Jenkinson, DM, Elder, HY, Montgomery, I, Moss, VA.** Comparative studies of the ultrastructure of the sebaceous gland. Tissue Cell 1985; 17: 683-98.

**Jenkinson, DM, Montgomery, I, Elder, HY.** The ultrastructure of the sweat glands of the ox, sheep and goat during sweating and recovery. *J Anat* 1979; 129: 117-40.

**Jenkinson, DM, Nay, T.** The sweat glands and hair follicles of European cattle. *Aust J Biol Sci* 1972; 25: 585-95.

**Karlson, P, Lüscher, M.** Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 1959; 183: 55-6.

**Kietzmann, M, Loscher, W, Arens, D, Maass, P, Lubach, D.** The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 30: 75-84.

**Kirfel, J, Peters, B, Grund, C, Reifenberg, K, Magin, TM.** Ectopic expression of desmin in the epidermis of transgenic mice permits development of a normal epidermis. *Differentiation* 2002; 70: 56-68.

**Landsteiner, K, Raubitschek, R.** Beobachtungen zur Hämolyse und Hämagglutination. *Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I: Orig.* 1908; 45: 660-7.

**Lassance, JM, Löfstedt, C.** Concerted evolution of male and female display traits in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *BMC Biol* 2009; 7: 10.

**Liebich, H, König, H.** Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis: Schattauer. 2011.

**Loeffler, K.** The blood supply of bovine skin. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1966; 79: 365-7.

**Lohr, M, Kaltner, H, Schwartz-Albiez, R, Sinowatz, F, Gabius, HJ.** Towards functional glycomics by lectin histochemistry: strategic probe selection to monitor core and branch-end substitutions and detection of cell-type and regional selectivity in adult mouse testis and epididymis. *Anat Histol Embryol* 2010; 39: 481-93.

**Ludewig, T, Michel, G, Gutte, G.** Histological and histochemical investigations on the structure of udder skin of cattle with special reference to changes during in vivo udder perfusion models. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1996; 103: 501-5.

**Meyer, W, Schwarz, R, Neurand, K.** Die Haut der Haussäugetiere (1) und (2). *Tierärztl prax* 1978; 6: 153-62 und 289-98.

**Michel, G.** Histological and histochemical studies of the innervation of the teat and the skin of the bovine udder. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1993; 135: 305-9.

**Michel, G.** Anatomie der Milchdrüse. In: *Euter- und Gesäugekrankheiten* (Wendt, K, Bostedt, H, Mielke, H, Fuchs, H-W, ed.). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, Jena 1994: 17-62.

**Milner, DJ, Mavroidis, M, Weisleder, N, Capetanaki, Y.** Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 2000; 150: 1283-98.

**Milner, DJ, Weitzer, G, Tran, D, Bradley, A, Capetanaki, Y.** Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* 1996; 134: 1255-70.

**Mody, R, Joshi, S, Chaney, W.** Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33: 1-10.



**Monteiro-Riviere, N.** Comparative anatomy, physiology and biochemistry of mammalian skin. In: Dermal and ocular toxicology (Hobson, DW, ed.): CRC Press 1991: 3-71.

**Morioka, K, Arai, M, Ihara, S.** Steady and temporary expressions of smooth muscle actin in hair, vibrissa, arrector pili muscle, and other hair appendages of developing rats. *Acta Histochem Cytochem* 2011; 44: 141-53.

**Mulisch, M, Welsch, U.** In: Romeis Mikroskopische Technik. 18 edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2010.

**Neufang, G, Furstenberger, G, Heidt, M, Marks, F, Muller-Decker, K.** Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7629-34.

**Ookusa, Y, Takata, K, Nagashima, M, Hirano, H.** Distribution of glycoconjugates in normal human skin using biotinyl lectins and avidin-horseradish peroxidase. *Histochemistry* 1983; 79: 1-7.

**Pavelka, M, Roth, J.** Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology: Springer Verlag. 2010.

**Romeis, B.** Mikroskopische Technik. Heidelberg: Spektrum-Akademischer Verlag. 2010.

**Rüdiger, H, Gabius, H.** Lektinologie: Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung. *Dtsch Apoth Ztg* 1993; 133: 2371-81.

**Rüdiger, H, Gabius, HJ.** Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J* 2001; 18: 589-613.

**Schaal, B, Coureaud, G, Langlois, D, Ginies, C, Semon, E, Perrier, G.** Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 2003; 424: 68-72.

**Schaefer, RL, Keller, KF, Doyle, RJ.** Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 669-72.

**Schaumburg-Lever, G.** Ultrastructural localization of lectin-binding sites in normal skin. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 465-70.

**Sharon, N.** Lectins: an overview. In: *Vertebrate Lectins* (Kahane, I, Parent, J, ed.). New York: Van Nostrand Reinhold Advanced Cell Biology Series 1987: 27-45.

**Sharon, N, Lis, H.** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14: 53R-62R.

**Sinowatz, F.** The integumentary system. In: *Essentials of Domestic Animal Embryology* (Hyttel, P, Sinowatz, F, Vejlsted, M, Betteridge, K, ed.): Saunders Elsevier 2010: 317-29.

**Sinowatz, F, Hees, H, .** Hautdecke und Anhangsgebilde. In: *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 4.edn. edn. (Sinowatz, F, ed.) 2006: 455-69.

**Stillmark, H** (1888). Diss.: Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L, und einigen anderen Euphorbiaceen Dorpat, Univ.

**Sumner, JB.** The globulins of the jack bean, *canavalia ensiformis*. *J Biol. Chem.* 1919; 37: 137-42.

**Sumner, JB, Howell, SF.** Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol* 1936; 32: 227-37.

**Talukdar, AH, Calhoun, ML, Stinson, AW.** Microscopic anatomy of the skin of the horse. *Am J Vet Res* 1972; 33: 2365-90.

**Tsubura, A, Fujita, Y, Sasaki, M, Morii, S.** Lectin-binding profiles for normal skin appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* 1992; 19: 483-9.

**Varendi, H, Porter, RH.** Breast odour as the only maternal stimulus elicits crawling towards the odour source. *Acta Paediatr* 2001; 90: 372-5.

**Von Kuster, L, Liwnicz, BH, Ward, DE.** Concanavalin A and Lens culinaris agglutinin binding patterns in normal and neoplastic sebaceous epithelium. *J Cutan Pathol* 1986; 13: 274-84.

**Weyrauch, KD, Smollich, A.** Haut und Hautorgane. In: *Histologie- Kurs für Veterinärmediziner*  
1998: 130-38.

**Whiteley, HE, Sundberg, JP.** Expression of lectin binding in cutaneous papillomas of animals. *J Comp Pathol* 1988; 99: 83-92.

**Wyatt, T.** Pheromones and animal behaviour. Communication by smell and taste: Cambridge University Press. 2003.

**Wyatt, TD.** Fifty years of pheromones. *Nature* 2009; 457: 262-3.

**Wyatt, TD.** Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2010; 196: 685-700.

---

**Xu, Y, Yang, L, Yang, T, Xiang, M, Huang, E, Lian, X.** Expression pattern of cyclooxygenase-2 in normal rat epidermis and pilosebaceous unit during hair cycle. *Acta Histochem Cytochem* 2008; 41: 157-63.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1: Übersicht über den Wirkmechanismus von Pheromonen mit „Releaser“- und „Primer“-Effekt auf ein Individuum (nach WYATT, 2003) CNS= Zentralnervensystem .....</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 2: Skizze der Entnahmestellen der Euterhautproben bei Kühen und Färsen der Rasse Fleckvieh.....</i>	<i>15</i>
<i>Abb. 3: Darstellung der Epidermisdicke der bovinen Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>28</i>
<i>Abb.4: Bovine Euterhaut der Zitze und des Euterkörpers .....</i>	<i>30</i>
<i>Abb. 5: Schweißdrüse der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>32</i>
<i>Abb. 6: Übersicht über die bovine Euterhaut .....</i>	<i>33</i>
<i>Abb. 7: Haaranlagen in der Dermis der bovinen Euterhaut der Zitzenbasis einer 26 Monate alten Färse .....</i>	<i>35</i>
<i>Abb. 8: Euterhaut einer 9 Jahre alten Kuh.....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 9: Euterhaut einer 19 Monate alten Färse .....</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 10: Bovine Euterhaut: Darstellung der Haaranlagen.....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 11: Expression von <math>\alpha</math>-SMA in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 12: Expression von Vimentin in der Euterhaut von Kühen und Färsen.....</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 13: Expression von GFAP in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 14: Expression von Desmin in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 15: Expression von Pancytokeratin in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 16: Expression von Kollagen-1 in der Euterhaut von Kühen.....</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 17: Expression von Laminin in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 18: Expression von COX-1 in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>55</i>
<i>Abb. 19: Expression von COX-2 in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>58</i>
<i>Abb. 20: Darstellung der Bindungseigenschaften von Canavalia ensiformis Agglutinin (Con-A) in der Euterhaut von Kühen und Färsen.....</i>	<i>64</i>
<i>Abb. 21: Darstellung der Bindungseigenschaften von Griffonia simplicifolia Lektin 1 (GSL-1) in der Euterhaut von Färsen .....</i>	<i>67</i>
<i>Abb. 22: Darstellung der Bindungseigenschaften von Wheat Germ Agglutinin (WGA) in der Euterhaut von Kühen und Färsen .....</i>	<i>70</i>

<i>Abb. 23: Übersicht über die apikalen Zellschichten der bovinen Epidermis</i> <i>(Hautlokalisation: Euterhaut, seitliches Hinterviertel)</i> .....	76
<i>Abb. 24: Detailansicht der apikalen bovinen Epidermis (Abbildung 23)</i> <i>(Hautlokalisation: Euterhaut, seitliches Hinterviertel)</i> .....	77
<i>Abb. 25: Ausschnitt aus dem Stratum granulosum der bovinen Epidermis</i> <i>(Hautlokalisation: Euterhaut seitliches Hinterviertel)</i> .....	78
<i>Abb. 26: Übersicht über das Stratum spinosum und das Stratum basale der</i> <i>bovinen Epidermis (Hautlokalisation: Zitzenspitze).....</i>	80
<i>Abb. 27: Detailansicht der Zell-/Zellkontakte der Keratinozyten des Stratum</i> <i>spinosum (Hautlokalisation: bovine Zitzenspitze)</i> .....	81
<i>Abb. 28: Keratinfilamente der Keratinozyten des Stratum spinosum</i> <i>(Hautlokalisation: bovine Zitzenbasis)</i> .....	82
<i>Abb. 29: Langerhans Zelle im Stratum spinosum (Hautlokalisation: bovine</i> <i>Zitzenbasis)</i> .....	83
<i>Abb. 30: Stratum basale und Merkelzelle in der bovinen Epidermis</i> <i>(Hautlokalisation: Euterhaut seitliches Hinterviertel)</i> .....	85
<i>Abb. 31: Ortsständige Strukturen und freie Zellen im Bindegewebe der Euterhaut</i> <i>(Hautlokalisation: Zitzenbasis).....</i>	87
<i>Abb. 32: Glatte Muskulatur in der bovinen Dermis der Euterhaut</i> <i>(Hautlokalisation: Zitzenbasis).....</i>	89
<i>Abb. 33: Interdigitationen der glatten Muskelzellen (Hautlokalisation: bovine</i> <i>Zitzenbasis)</i> .....	90
<i>Abb. 34: Markloser Nerv in der bovinen Dermis (Hautlokalisation: Zitzenbasis).....</i>	92
<i>Abb. 35: Kapillare in der bovinen Euterhaut (Hautlokalisation: Zitzenbasis).....</i>	94
<i>Abb. 36: Kapillare und Mastzelle in der bovinen Dermis (Hautlokalisation:</i> <i>Zitzenspitze)</i> .....	95
<i>Abb. 37: Holokrine Talgdrüsenzelle der bovinen Dermis (Hautlokalisation:</i> <i>seitliche Euterhaut Hinterviertel)</i> .....	97



## X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Lektingruppen und die verwendeten Lektine in der Übersicht.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht über die beprobten Rinder .....</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 3: Einteilung und Herkunft der verwendeten Lektine .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper, Verdünnungen, Inkubationszeiten, Herkunft der Primär- und Sekundärantikörper, Vorbehandlungen .....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 5: Immunhistochemischer Nachweis von <math>\alpha</math>-SMA in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 6: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 7: Immunhistochemischer Nachweis von GFAP in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 8: Immunhistochemischer Nachweis von Desmin in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 9: Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-1 in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von Laminin in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von COX-1 in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von COX-2 in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 14: Bindungsmuster von PSA in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 15: Bindungsmuster von ConA in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 16: Bindungsmuster von LCA in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 17: Bindungsmuster von GSL-1 in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 18: Bindungsmuster von SNA in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 19: Bindungsmuster von WGA in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 20: Bindungsmuster von s-WGA in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 21: Bindungsmuster von PHA-L in der bovinen Euterhaut .....</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 22: Bindungsmuster von PHA-E in der bovinen Euterhaut.....</i>	<i>73</i>

## XI. ANHANG

### 1. Lichtmikroskopie

#### 1.1. Chemikalien zur Fixierung

##### Bouin'sche Lösung

• Gesättigte wässrige Pikrinsäure <sup>1</sup>	375 ml
• 37% Formaldehyd <sup>1</sup>	125 ml
• 100% Essigsäure (Eisessig) <sup>2</sup>	25 ml

##### 3,7% Formol

• DEPC <sup>2</sup> -Wasser	567 ml
• PBS-10xKonzentrat (Phosphate Buffered Saline Solution) <sup>1</sup>	63 ml
• 37% Formaldehyd	70 ml

#### 1.2. Puffer

##### Citrat-Puffer (pH 6,0)

• Stammlösung A:	
Citrat	21,01 g
Aqua dest.	ad 1 l
• Stammlösung B:	
Natriumcitrat	29,41 g
Aqua dest.	ad 1 l
• Gebrauchslösung:	
Lösung A	9 ml
Lösung B	41 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

**PBS-Puffer (pH 7,4-7,6)**

• NaCl	42,5 g
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,35 g
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,95 g
• Aqua dest.	ad 5 l

**DEPC-Wasser**

• Diethylpyrocarbonat C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1,5 ml
• Aqua dest.	ad 2 l, danach autoklavieren

**1.3. Lösungen für die histologischen Färbungen****Hämalaun-Eosin (HE) nach Meier***Hämalaun:*

• Hämatoxilin <sup>1</sup>	2 g
• Natriumjodat <sup>4</sup>	0,4 g
• Kalialaun p.A. <sup>3</sup>	100 g
• Chloralhydrat <sup>3</sup>	100 g
• Zitronensäure krist. <sup>5</sup>	2 g
• Aqua dest.	ad 2 l

*Eosin:*

1% Stammlösung:

- |                      |           |
|----------------------|-----------|
| • Eosin <sup>1</sup> | 2 g       |
| • Aqua dest.         | 198 ml    |
| • 37% Formaldehyd    | 5 Tropfen |

Verdünnung für Färbung:

- |                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| • Stammlösung     | 1 Teil                      |
| • Aqua dest.      | ad 10 Teile                 |
| • 100% Essigsäure | 5 Tropfen/100 ml Verdünnung |

**PAS-Reaktion nach Mc Manus** *$\alpha$ -Amylase 0,5%:*

• $\alpha$ -Amylase <sup>3</sup>	10 mg
• Aqua dest.	2 ml

*0,5% wässrige Perjodsäure:*

• Perjodsäure <sup>3</sup>	1 g
• Aqua dest.	200 ml

*Schiff'sches Reagenz<sup>3</sup>**SO<sub>2</sub>-Wasser:*

• N-Salzsäure:	Salzsäure konz.	3 ml
	Aqua dest.	27 ml
• 10% Natriumpyrosulfitlösung:	Natriumpyrosulfit <sup>3</sup>	3,003 g
	Aqua dest.	30 ml
• Leitungswasser		600 ml

*Hämalaun***Alcianblau***Alcianblau pH 2,5:*

• Alcianblau <sup>3</sup>	1 g
• 3% Essigsäure	ad 100 ml
pH Einstellung und Filtration	
• Thymol krist. <sup>3</sup>	0,5 g

*Alcianblau pH 1,0:*

• Alcianblau	1 g
• 0,1 N Salzsäure <sup>5</sup>	ad 100 ml
pH Einstellung und Filtration	
• Thymol <sup>3</sup>	0,5 g

*3% Essigsäure:*

• Essigsäure 100%	30 ml
• Aqua dest	ad 1 l

*Kernechtrot<sup>1</sup>***Trichromfärbung nach Masson und Goldner***Eisenhämatoxylin nach Weigert:*

• Lösung A:	Hämatoxylin	1 g
	96% Ethanol	100 ml
• Lösung B:	Eisen(III)chlorid <sup>3</sup>	2,48 g
	Aqua dest.	100 ml
	Salzsäure konz. <sup>3</sup>	1 ml
• Mischung Lösung A und B im Verhältnis 1:1		

*Azophloxin:*

• Azophloxin <sup>1</sup>	0,5 g
• Eisessig	0,2 ml
• Aqua dest.	100 ml

*Phosphormolybdänsäure-Orange:*

• Phosphorwolframsäure <sup>3</sup>	3-5 g
• Orange G4	2 g
• Aqua dest.	100 ml

*Lichtgrün:*

• Lichtgrün <sup>3</sup>	0,2 g
• Eisessig	0,2 ml
• Aqua dest.	100 ml

**Resorcin-Fuchsin-van-Gieson***Resorcinfuchsinlösung:*

• Lösung A:	Fuchsin	2 g
	Resorcin	4 g
	Aqua dest.	200 ml
• Lösung B:	Eisen(III)chlorid	8 g
	Aqua dest.	40 ml
• Lösung A und B Erhitzen und filtrieren mischen		
	Ethanol 96%	350 ml
	Salzsäure konz.	2,8 ml

*Eisenhämatoxylin nach Weigert:*

• Lösung A:	Hämatoxylin	1 g
	96% Ethanol	100 ml
• Lösung B:	Eisen(III)chlorid <sup>3</sup>	2,48 g
	Aqua dest.	100 ml
	Salzsäure konz. <sup>3</sup>	1 ml
• Mischung Lösung A und B im Verhältnis 1:1		

*Pikrinsäure-Thiazinrot:*

• Gesättigte wässrige Pikrinsäure	100 ml
• 1% wässrige Thiazinlösung (0,2 g Thiazinrot+ 20 ml Aqua dest.)	7,5 ml



## 2. Immunhistochemie

*PBS (Phosphate-Buffered-Saline-Solution) (pH 7,4-7,6): s. Lichtmikroskopie*

*Vorbehandlungen:*

Mikrowellenvorbehandlung (2 bzw. 3x10 min) in Citratpuffer (pH 6,1):	Stammlösung A:		
	Zitronensäure <sup>3</sup> 0,1 M:	Zitronensäure	21,01 g
		Aqua dest.	ad 1 l
	Stammlösung B:		
	Natriumcitrat <sup>3</sup> 0,1 M:	Natriumcitrat	29,4 g
		Aqua dest.	ad 1 l
Protease 0,1% <sup>1</sup> (10 min/RT)			
Trypsin <sup>1</sup> (20 min/RT)			

*7,5% Hydrogenperoxidlösung:*

• 30% Hydrogenperoxidlösung <sup>3</sup>	50 ml
• Aqua dest.	150 ml

*StreptAB-Complex<sup>1</sup>*

*Protein Block Serum Free with Background reducing components<sup>1</sup>*

*DAB-Hydrogenperoxidlösung:*

• Stammlösung Hydrogenperoxid:	30% Hydrogenperoxid	0,15 ml
	PBS-Puffer (pH 7,5)	50 ml
• DAB-Lösung:	DAB-Tabletten <sup>1</sup> (10 mg)	6 Stück
	Aqua dest.	60 ml
➔ 0,4 ml Hydrogenperoxid-Stammlösung mit 60 ml DAB-Lösung mischen		

### 3. Elektronenmikroskopie

#### 3.1. Chemikalien zur Fixierung

*Karnovsky-Stammlösung:*

• 10% Paraformaldehydlösung*	20 ml
• Cacodylat-Puffer, 0,2 M (pH 7,2)	50 ml
• Kalziumchlorid (wasserfrei) <sup>1</sup>	0,05 g
*:	
• Paraformaldehyd	10 g
• Aqua dest.	ad 100 ml
• Natriumhydroxid 1M	bis zu 6 Tropfen

*Fixierlösung nach Karnovsky:*

• Karnovsky-Stammlösung (s.o.)	8 ml
• Glutaraldehyd 25% <sup>1</sup>	1,37 ml

#### 3.2. Puffer

*Cacodylat-Puffer 0,2 M (pH 7,2):*

• Lösung A:	Natriumcacodylat <sup>6</sup> Aqua dest.	8,56 g ad 200 ml
➔ Lösung A		50 ml
• Lösung B:	Aqua dest. Salzsäure 0,2 M <sup>5</sup>	100 ml pH einstellen
➔ Lösung B		100 ml

*Cacodylat-Puffer 0,1 M (pH 7,2):*

• Cacodylat-Puffer 0,2 M (pH 7,2)	50 ml
• Aqua dest.	50 ml

### 3.3. Kontrastierungslösungen

2% Osmiumtetroxid-Lösung:	4% Osmiumtetroxid <sup>1</sup> Cacodylat-Puffer 0,1 M	2 ml 2 ml
3% Kaliumferrocyanid-Lösung:	Kaliumferrocyanid <sup>9</sup> Cacodylat-Puffer 0,1 M	0,3 g ad 10 ml
Osmiumtetroxid(1%)- Kaliumferrocyanid(1,5%) in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer	2% Osmiumtetroxid- Lösung 3% Kaliumferrocyanid- Lösung	4 ml 4 ml

### 3.4. Einbettmedien

*Propylenoxid*<sup>8</sup>

*Epon:*

• Poly/Bed 812 <sup>8</sup>	20 ml
• DDSA <sup>8</sup>	16 ml
• NMA <sup>8</sup>	10 ml
• BDMA <sup>8</sup>	1,4 ml

### 3.5. Färbe- und Nachkontrastierungsmedien

*Methylenblau nach Richardson:*

• Lösung A:	Methylenblau <sup>1</sup> 1% Borax (Natriumtetra- boraldehydrat)	1 g 100 ml
➔ Lösung A		100 ml
• Lösung B:	Azur n <sup>7</sup> Aqua dest.	1 g ad 100 ml
➔ Lösung B		100 ml

*Uranylacetat*<sup>6</sup> (gesättigte Lösung)

*Bleicitratlösung nach Reynolds (pH~12):*

• Natriumcitrat:	Natriumcitrat <sup>3</sup> Aqua dest.	35,7 g ad 100 ml
➔ Natriumcitrat		3 ml
• Bleinitrat	Bleinitrat <sup>3</sup> Aqua dest.	33,1 g ad 100 ml
➔ Bleinitrat		2 ml
• Aqua dest.		ad 100 ml
• 1 M Natriumhydroxid		Tropfenweise zugeben (für pH-Wert)

**4. Glykohistochemie***PBS-Puffer (pH 7,4-7,6): s. Lichtmikroskopie (S. 131)**Protein Block Serum Free with Background reducing components<sup>1</sup>**DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Verdünnung):*

• DAPI-Verdünnung <sup>1</sup> (1 µg/µl)	1 µl
• PBS pH 7,4	1 ml

1 Fluka Chemie GmbH, Steinheim

2 Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3 Merck, Darmstadt

4 Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover

5 Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

6 Serva, Heidelberg

7 Polysciences Inc., Warrington, USA

8 Grubler, Stuttgart-Untertürkheim

9 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## **XII. DANKSAGUNG**

Zu aller erst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Herrn Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Zudem bedanke ich mich für die stets gute Betreuung und kompetente Beratung in allen fachlichen Dingen. Weiter danke ich ihm für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Dr. K. Ebach danke ich für die Betreuung und Einweisung bei der Probenahme im Schlachthof München. Ihre große Hilfsbereitschaft in vielen Belangen, unter anderem bei der Methodik der Probenbearbeitung wird mir in Erinnerung bleiben.

Danken möchte ich auch Frau Dr. R. Kenngott und Dr. D. Rodler die mir stets bei all meinen Fragen Rund um das Thema Doktorarbeit zur Seite standen.

Herrn Dr. F. Habermann danke ich vielfmals für die ausführlichen und kompetenten Einweisungen in die Benutzung der Mikroskope und des Photoshop Programms.

Für die stets engagierte Unterstützung bei allen Laborangelegenheiten rund um die licht- und glykohistochemischen Techniken danke ich Herrn Y. Gök.

Ebenso möchte ich Frau G. Rußmeier für die Einweisung in die Immunhistochemie danken.

Ein großer Dank gilt Frau W. Scholz für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der Transmissionselektronenmikroskopie.

Frau M. Settles danke ich für Ihre große Hilfsbereitschaft und die gute Betreuung im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Björn, meiner Familie, Julia und Sarah für die stets optimistische und geduldige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit danken.